

**В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников**

**МИКРОБНЫЕ БИОПЛЕНКИ В  
КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ  
И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ**

Витебск 2017

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»**

**В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников**

**МИКРОБНЫЕ БИОПЛЕНКИ В КЛИНИЧЕСКОЙ  
МИКРОБИОЛОГИИ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ**

**Монография**

Витебск  
2017

УДК 616. 716. 8 – 002. 3 – 085. 272

ББК 53.533

О-52

Рекомендовано к изданию научно-техническим советом УО ВГМУ  
(протокол № 5 от 1.06.2017 г.)

Рецензенты: заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии  
ГУО БелМАПО, профессор, доктор медицинских наук, Н.Д. Коломиец;  
профессор кафедры хирургической стоматологии, доктор медицинских  
наук, профессор О.П. Чудаков.

Окулич, В.К.

Микробные биопленки в клинической микробиологии и  
антибактериальной терапии / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В.  
Плотников. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с. : ил.

ISBN 978-985-466-896-0

В монографии изложен блок современной информация по строению,  
функционированию микробных биопленок, а также их роли в развитии  
патологии человека. Описаны методы исследования бактериальных  
биопленок, представлены данные об антибактериальных препаратах,  
спектре их антимикробного действия, а также схемы рациональной  
антибиотикотерапии хирургической инфекции с учетом способности  
возбудителей формировать биопленку.

Издание адресовано врачам-хирургам, урологам, травматологам,  
стоматологам, челюстно-лицевым хирургам, реаниматологам,  
эпидемиологам, клиническим микробиологам, химиотерапевтам, студентам,  
клиническим ординаторам, магистрантам, аспирантам и может быть  
полезным врачам других специальностей.

УДК 616. 716. 8 – 002. 3 – 085. 272

ББК 53.533

ISBN 978-985-466-896-0

© В.К. Окулич, А.А. Кабанова,  
Ф.В. Плотников, 2017

© УО «Витебский государственный  
медицинский университет», 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Раздел</b>	<b>Стр.</b>
Оглавление	3
Перечень сокращений и условных обозначений	7
ВВЕДЕНИЕ	8
1. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ – БИОПЛЕНОК	10
2. ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ	14
2.1 Основные группы патогенных микроорганизмов	14
2.2 Классификация микроорганизмов	15
2.3 Основные свойства бактерий, лежащие в основе их идентификации	17
2.4 Основы генетики микроорганизмов	25
3. ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС	34
3.1 Патогенность и вирулентность	36
3.2 Иммуитет и инфекция	48
3.3 Критерии этиологической роли условно-патогенных микробов	51
4. АНТИМИКРОБНАЯ ТЕРАПИЯ	54
4.1 Рациональная антибактериальная терапия	55
4.2 Монотерапия	57
4.3 Комбинированное назначение антибактериальных препаратов	57
4.4. Классификация антибиотиков	59
5. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА	61
5.1 Группа пенициллинов	61
5.2 Группа цефалоспоринов	67
5.3 Группа монобактамов	73
5.4 Группа карбапенемов	74
5.5 Группа аминогликозидов	75
5.6 Группа тетрациклинов	78
5.7 Группа макролидов	80
5.8 Группа левомицетина	83
5.9 Группа линкозамидов	84
5.10 Группа анзамицинов	85
5.11 Полимиксины	85
5.12 Бацитрацины	86
5.13 Гликопептиды	86
5.14 Хинолоны	87
5.15 Оксазолидиноны	91
5.16 Нитрофураны	92
5.17 Производные нитроимидазола	92
5.18 Сульфаниламидные препараты	93
5.19 Ингибиторы дигидрофолат–редуктазы	95

5.20 Препараты «разных» групп	96
6. АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ	98
6.1 Фенотипическая и генотипическая резистентность к антимикробным препаратам	100
6.2 Механизмы резистентности микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам	102
6.3 Вторичная резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам	103
6.4 Механизмы резистентности микроорганизмов к отдельным группам антибиотиков	103
6.5 Механизмы образования устойчивых популяций Микроорганизмов	107
6.6. Развитие резистентности в клинических условиях	107
6.7 Факторы, способствующие селекции и распространению антибиотикорезистентных изолятов	108
6.8 Борьба с лекарственно устойчивыми бактериями	109
6.9 Ограничение развития устойчивости к противобактериальным препаратам	109
6.10 $\beta$ -лактамазы	110
6.11 Причины развития повышенной резистентности микроорганизмов, способных формировать биоплёнки	111
7. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ В МИКРОБИОЛОГИИ. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК	115
7.1 Бактериологический или культуральный метод	120
7.2 Методы культивирования микробных биопленок	128
7.3 Микроскопический (бактериоскопический) метод	131
7.4 Индикация и количественное определение образования биоплёнки в полистироловом планшете	136
7.5 Индикация и исследование биоплёнок с помощью флуориметрии	138
7.6 Индикация и количественное определение биоплёнки на поликарбонатной мембране	139
7.7 Методы генетического анализа микроорганизмов	140
7.8 Серологический метод	142
7.9 Биологический (экспериментальный) метод или метод биопробы	143
7.10 Аллергический метод	143
7.11 Определение количества бактерий в исследуемом материале	143
7.12 Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам	146
8. МЕТОДЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА БИОПЛЁНКИ	153
8.1 Химиопрепараты и биопленки	153
8.2 Ферменты и биопленки	155

8.3 Физические факторы, металлы и биопленки	156
8.4 Антимикробные пептиды и биопленки	156
8.5 Бактериофаги и биопленки	157
8.6 Блокаторы Quorum sensing	158
8.7 Предотвращение формирования биопленок на имплантируемых устройствах	159
8.8 Методы лечения гнойных ран, воздействующие на биопленку	160
9. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ВОЗДЕЙСТВОВАТЬ НА БИОПЛЕНКУ	163
9.1 Метод изучения воздействия различных веществ на матрикс биоплёнки, сформированной на мембране из инертного полимера	163
9.2 Метод разрушения матрикса биоплёнки ультразвуком	164
9.3 Метод определения проникновения антибиотиков через биопленку	165
9.4 Действие антисептиков на микробные сообщества	166
9.5 Действие ферментов на микробные сообщества	167
9.6 Действие антибактериальных препаратов на микробные сообщества	169
9.7 Действие факторов иммунитета на микробные сообщества	174
10. КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЁНОК МИКРООРГАНИЗМАМИ-ВОЗБУДИТЕЛЯМИ	178
10.1 Способность микроорганизмов формировать биоплёнки	187
10.2 Клинические показатели пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности возбудителя формировать биопленку	191
10.3 Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами с учетом способности возбудителей формировать биопленку	195
10.4 Клинические показатели пациентов с гнойными ранами при использовании комплексного метода лечения с учетом способности микроорганизмов формировать биопленку	196
11. АНТИБИОТИКОТЕРАПИЯ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ С УЧЕТОМ СПОСОБНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКУ	201
11.1 Алгоритм антибактериальной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний с учетом способности возбудителя формировать биопленку	201
11.2 Идентификация и определение чувствительности к антибактериальным препаратам возбудителей основных возбудителей гнойно-воспалительных осложнений синдрома диабетической стопы	202
11.3 Идентификация и определение чувствительности антибактериальным препаратам возбудителей наиболее распространенных хирургических инфекций	206
11.4 Фурункулы, фурункулез и карбункулы	211
11.5 Абсцессы	216

11.6 Флегмоны	226
11.7 Гематогенный остеомиелит	238
11.8 Инфекция трофических язв	244
11.9 Основные возбудители послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений (нагноений ран, лигатурных свищей и абсцессов), их резистентность к антибактериальным препаратам	249
11.10 Посттравматический остеомиелит	253
11.11 Гнойные раны	261
11.12 Лимфадениты челюстно-лицевой области	267
11.13 Периостит челюсти	270
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	274
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	275

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБ – антибиотик  
АБ-резистентность – антибиотикорезистентность  
АБТ – антибактериальная терапия  
БП – биопленка  
ВБИ – внутрибольничная инфекция  
В/в – внутривенно  
ВИЭФ – встречный иммуноэлектрофорез  
В/м – внутримышечно  
ГЭБ – гемато-энцефалический барьер  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
ЕД – единица действия  
Е<sub>оп</sub> – единица оптической плотности  
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт  
ИФА – иммуноферментный анализ  
КОЕ – колонии образующие единицы  
КОС – коагулазоотрицательный стафилококк  
КПС – коагулазоположительный стафилококк  
МБК – минимальная бактерицидная концентрация  
МПК – минимальная подавляющая концентрация  
МСД – максимальная суточная доза  
НГОП – неферментирующие грамотрицательные палочки  
ОП – оптическая плотность  
ПСБ – пенициллин-связывающие белки  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РА – реакция агглютинации  
РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов  
РИФ – реакция иммунофлуоресценции  
РНИФ – реакции непрямой иммунофлуоресценции  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
РП – реакции преципитации  
РПГА – реакция пассивной гемагглютинации  
РТГА – реакция торможения гемагглютинации  
ССД – среднесуточная доза  
LQ – нижний квартиль  
Me – медиана  
MRSA – метициллинрезистентный стафилококк  
MSSA – метициллинчувствительный стафилококк  
NaCl – хлорид натрия  
PRSA – пенициллинрезистентный стафилококк  
T<sub>1/2</sub> – период полувыведения  
QS – quorum sensing, чувство кворума  
UQ – верхний квартиль



## ВВЕДЕНИЕ

Клиническая микробиология как раздел медицинской микробиологии призвана решать две основные задачи: этиологическая диагностика инфекционного процесса и выбор рациональных средств этиотропной терапии. Обе эти задачи непосредственно связаны между собой и без успешного решения первой, как правило, невозможно решение второй. Выбор рациональных средств терапии может быть осуществлен аналитическим путем, на основании представлений об этиологии процесса, либо с помощью дополнительных исследований, например, определения чувствительности выделенных микроорганизмов к антибиотикам. С другой стороны, успех этиотропной терапии, заключающийся в улучшении состояния пациента и одновременном исчезновении возбудителя из организма, является наиболее значимым подтверждением правильности этиологического диагноза.

Процесс смены ведущих возбудителей инфекций стал особенно динамичным на рубеже XX-XXI столетий. Так в 50-60 гг. «чумой XX века» называли стафилококк, 70-80 гг. – грамотрицательную аэробную микрофлору, сейчас установлен факт ассоциативной аэробно-анаэробной микробной агрессии при гнойных хирургических заболеваниях.

Представления об этиологической структуре инфекционных заболеваний, в том числе стоматологической патологии, за последнее время существенно расширились. Бактерии не единственные микроорганизмы, способные служить причиной инфекционных процессов. В настоящее время отмечается значительное увеличение роли грибов, вирусов и простейших в инфекционной патологии [1, 2, 3], высокую агрессивность проявляют такие новые патогены, как прионы [4, 5, 6].

Недостаточная эффективность проводимого лечения инфекции в определенной мере объясняется наличием у микроорганизмов действенных механизмов защиты от внешних повреждающих факторов. Широкое применение антисептиков и дезинфектантов в лечебных учреждениях, профильных лабораториях биотехнологических и пищевых производств, а также в повседневной жизни обеспечивает выраженное селективное действие на популяции микроорганизмов и способствует отбору резистентных изолятов. Устойчивость микроорганизмов к антимикробным препаратам может быть природной или приобретенной [7, 8]. Первый вид устойчивости характеризуется отсутствием у микроорганизмов мишени для действия антимикробного препарата или ее недоступностью. Приобретенная устойчивость возникает в результате воздействия на микроорганизмы антимикробных препаратов, особенно в их низких концентрациях [9, 10]. В последнее десятилетие изучению механизмов выживания бактерий придается особое значение [11].

В настоящее время основной частью микробиологов признано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде структурированных,

прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок [11]. Биопленка – микробное сообщество, характеризующееся клетками, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфичных генов. Установлено, что резистентность возбудителей в составе биопленки возрастает во много раз по сравнению с планктонными микроорганизмами, что требует дальнейшего детального изучения [12].

Таким образом, на сегодняшний день образование биоплёнок госпитальными изолятами бактерий является серьезной угрозой для практического здравоохранения. Разрабатываются новые подходы для идентификации и изучения биопленок, реакций иммунного ответа на инфекции, связанные с биоплёнками, меняется тактика антибиотикотерапии, а также ведется поиск ингибиторов межклеточной сигнализации, ферментов и других методов разрушения биоплёнок.

## **1. ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ – БИОПЛЕНОВ**

Проблема профилактики и лечения инфекционных заболеваний является одной из приоритетных в практическом здравоохранении. В общей структуре хирургической заболеваемости гнойно-воспалительные процессы, в том числе челюстно-лицевой области, занимают одно из ведущих мест, они наблюдаются у 40-60% всех хирургических пациентов [13, 14].

Исследование этиологии инфекционных заболеваний вплоть до настоящего времени проводилось на основе определения чистых культур микроорганизмов, выделенных из патологического очага. Этот традиционный путь культивирования способствовал исследованию бактерий и прояснил многие аспекты физиологии микроорганизмов, однако рост чистой культуры во взвешенном состоянии встречается в природе крайне редко [15]. В настоящее время основной частью микробиологов признано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок.

Характерное свойство всех биопленок – их поразительная устойчивость к физическим и биохимическим воздействиям, включающая АБ-резистентность [16]. Несмотря на то, что эта устойчивость признана много лет, ее биологическое обоснование до сих пор до конца не изучено. Фактор, который частично объясняет устойчивость фенотипа, включает высокую клеточную плотность и физическое вытеснение АБ. В пределах БП могут происходить физиологические изменения, включающие реакцию общего стресса, закрытие ключевых метаболических процессов и индукцию защитных механизмов [17]. Популяция клеток в составе биопленки гетерогенна, содержит быстро- и медленно растущие бактерии. Ряд из них устойчивы к АБ за счет экспрессии инактивирующих ферментов, другие – не экспрессируют подобные вещества. Резистентность зависит от взаимодействия между популяцией клеток и терапией, направленной против мультиклеточного сообщества [18].

Образование биопленок – комплексный процесс. Считается, что единственным условием, помимо присутствия микроорганизмов, для образования БП является наличие относительно плотной и увлажненной поверхности неорганического или органического происхождения. В формировании биопленки выделяются несколько фаз: адгезия – микробы «прилипают» к поверхности с помощью факторов адгезии, таких как реснички или пили; колонизация – межклеточная адгезия и формирование микроколоний как отправная точка формирования сложной структуры биопленки, в эту фазу происходит транскрипция генов, необходимых для продукции внеклеточных полисахаридов; созревание – процесс, требующий наличия особых коммуникативных сигналов, способных

регулировать внутри БП экспрессию генов и белков, а также распределение видов [19]. Из сформированной биопленки происходит выделение или дисперсия планктонных микроорганизмов в окружающую среду.

Лабораторные исследования показали, что планктонные бактерии, в частности, стафилококки, стрептококки, псевдомонады, кишечная палочка присоединяются друг к другу в течение нескольких минут [20]. В течение 2-4 часов бактерии образуют прочно соединенные микроколонии, вырабатывают внеклеточные полисахариды, что делает их значительно толерантными к действию биоцидов, например, антибиотиков, антисептиков и дезинфектантов. В течение 6-12 часов формируются зрелые колонии БП, микроорганизмы которых проявляют высокую устойчивость к биоцидам. Такие биопленки быстро восстанавливаются после механического разрушения и вновь формируют зрелую форму в течение 24 часов. В зависимости от вида микроорганизма и условий роста в течение 2-4 дней уменьшается количество планктонных бактерий.

Изначальное прикрепление микробной клетки к поверхности субстрата осуществляется за счет действия электростатических, гидрофобных сил, сил Ван дер Вальса, неспецифической адгезии. У грамотрицательных микроорганизмов важную роль в адгезии и клеточной агрегации играют жгутики и фимбрии [21]. Установлено, что степень адгезии с последующим формированием БП наиболее выражена к таким материалам, как латекс, силикон, поливинилхлорид. Адгезия к тефлону, полиуретану, нержавеющей стали и титану проявляется в меньшей степени. Все вышеперечисленные материалы широко применяются в медицинской практике, что является дополнительным фактором формирования биопленок и приводит к развитию инфекций с клинической резистентностью к АБТ [22].

В изучении структуры БП использовались разнообразные методы визуализации, включая световую микроскопию с компьютерной обработкой изображения, просвечивающую и сканирующую электронную микроскопию [23]. Для характеристики биоплёнок на внедряемых медицинских устройствах, в том числе при инфекции эндокарда, преимущественно использовали электронную микроскопию [24]. Однако использование этих методов способствовало обманчиво упрощённому представлению о БП, учитывая необходимость полного обезвоживания гидратированного матрикса при электронной и эффекты фокального искажения при световой микроскопии. Поэтому первоначально биоплёнки воспринимались и описывались как неструктурированные разрастания бактериальных клеток, окруженные экзополисахаридным матриксом.

Применение конфокальной сканирующей лазерной микроскопии для исследования биоплёнок радикально изменило восприятие их структурных и функциональных особенностей. Этот метод дал возможность исследовать биоплёнки *in situ* без ограничений, с которыми сталкивается электронная микроскопия, хотя и при более низких увеличениях. С

помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии стало ясно, что структура биоплёнок не является гомогенным монослоем микробных клеток [25]. Матрикс биоплёнки состоит из смеси полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и других веществ. Бактериальные экзополисахариды – главный компонент матрикса биоплёнки, который некоторые авторы называют также гликокаликсом или слизистым чехлом. Основным его компонентом является связанная вода. Все БП высоко гидратированы, некоторые до 73% состоят из внеклеточного материала, включая водные каналы и экзополисахариды [26]. У большинства видов экзополисахаридный матрикс состоит из альгината и является преимущественно анионным. Матрикс является трехмерной структурой, которая окружает, закрепляет и защищает прикрепленные к различным поверхностям микроколонии бактерий.

Клетки в матриксе располагаются определенным образом. Структура многоклеточных кластеров представлена в виде образований, напоминающих столбы, «цементированных» в экзополисахаридный слой, что позволяет поддерживать концентрацию питательных веществ, необходимых для роста популяции, а также служит защитой клеток [27]. Матрикс разделен водосодержащими каналами, а также имеет полости и пустоты. Поры и каналы, пронизывающие всю биоплёнку – очень важная часть ее структуры. Образно их можно сравнить с кровеносной системой ткани БП. При использовании гранулометрических методов было доказано движение потока жидкости через эти каналы [28]. Они позволяют свободно распространяться по всей толщине биоплёнки низкомолекулярным веществам, например, флуоресцеину, из чего следует, что эти вещества примерно одинаково доступны всем клеткам БП. Таким образом, каналы – жизненно важный элемент структуры биоплёнки, непосредственно влияющий на её функции, однако механизмы их формирования и поддержания ещё не вполне ясны. Каналы обеспечивают распространение питательных веществ и обмен продуктами метаболизма с окружающей жидкостью. Измерение *in situ* растворённого кислорода с использованием микроэлектродов показало, что кислород, как и субстраты, доступен в любой точке БП, из чего следует, что каналы транспортируют окисленную жидкость по всей толщине микробного сообщества [29]. При этом биоплёнки непроницаемы для достаточно крупных молекул большинства АБ [30].

Клетки бактерий в биопленке имеют сложную полиморфную организацию с определенной цитоархитектоникой, выявляются клетки с сильно измененной морфологией, мертвые клетки [29]. Многослойная топография влияет на метаболизм и физиологическую активность клеток. Периферические слои более аэрированы по сравнению с центральными частями, где образуются благоприятные условия для анаэробов [31]. Сниженный метаболизм микроорганизмов в биопленке ведет к появлению АБ-резистентности, так как антибактериальные препараты наиболее эффективны в отношении метаболически активных клеток [32].

Биоплёнки, сформированные одним видом *in vitro*, при сравнении с ассоциациями, образованными в естественных экосистемах (так называемый смешанный консорциум видов) демонстрируют общие структурные особенности [33]. На структуру БП влияют многочисленные внешние условия: свойства поверхности, количество доступных питательных веществ, видовой состав микробного сообщества [34].

В химическом отношении матрикс биоплёнки неоднороден и различается у разных микроорганизмов [35]. Экстрацеллюлярный слой содержит до 40–95% полисахаридов [36, 37]. Концентрация других химических компонентов очень сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов до 40% и нуклеиновых кислот 1-20%. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, так как 80-90% объема биопленки занимает вода [38]. Концентрация внеклеточной ДНК различна в разных частях БП. Так, в 4-х дневной биоплёнке, состоящей из грибоподобных структур, внеклеточная ДНК преимущественно локализовалась в «ножках» грибоподобных структур с наибольшей концентрацией во внешней части «ножек» на границе между «ножкой» и «шляпкой». Формирование грибоподобной формы биоплёнки является стадийным процессом. Сначала субпопуляция неподвижных клеток растёт в определённом направлении, формируя «ножку». Затем мигрирующая субпопуляция формирует «шляпку» посредством процесса, для которого необходимы пили IV типа. Ещё до конца не известно, каким образом передвижение клеток приводит к формированию «шляпки», однако существует мнение, что причиной скопления клеток на вершине «ножки» является сродство пилей IV типа к ДНК [39].

Таким образом, биопленки представляют собой сложную многоуровневую систему, изучению которой на сегодняшний день придается огромное значение в медицине. С позиций представлений о БП, как о форме существования бактерий в очаге инфекции, необходимо пересматривать многие принципы микробиологических исследований, а также искать пути эффективной борьбы с биопленками.

## 2. ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Патогенность (болезнетворность) является важным видовым признаком и представляет собой потенциальную возможность микроорганизма вызывать заболевание. Патогенность влияет на специфику инфекционного процесса, всегда закреплена генетически и зависит от образования микроорганизмами токсинов, ферментов агрессии и инвазии, наличия рецепторов к клеткам-мишеням хозяина.

Вирулентность – степень патогенности (иногда используют как синоним патогенности), является индивидуальным фенотипическим признаком каждого отдельного клона микроорганизма и измеряется наиболее точно минимальными смертельными дозами (DLM или LD 50). Высоковирулентные микроорганизмы в малых дозах могут вызывать заболевания, в т.ч. у иммунологически здоровых лиц, в то время как условно-патогенные вызывают инфекционный процесс только при наличии ряда условий (ослабление макроорганизма на фоне, например, иммунодефицита, большой дозы инфекционного агента, нарушения целостности кожного покрова, слизистой и т.п.)

Вирулентность патогенных бактерий определяется:

- адгезией, т.е. способностью избирательно прикрепляться к клеткам макроорганизма;
- колонизацией, т.е. способностью размножаться на поверхности клеток макроорганизма;
- способностью формировать биопленки;
- пенетрацией, т.е. способностью проникать в клетки хозяина;
- инвазией, т.е. способностью микроорганизмов преодолевать защитные барьеры макроорганизма, проникать в ткани, размножаться и диссеминировать;
- агрессией, т.е. способностью преодолевать неспецифические и специфические факторы иммунитета;
- токсигенностью, т.е. способностью образовывать экзотоксины.

Для характеристики микроорганизмов используется также понятие метаболическая активность, т.е. способность бактерий продуцировать биологически активные вещества: экзотоксины, ферменты агрессии и инвазии и т.п.

### 2.1 Основные группы патогенных микроорганизмов

Бактерии относятся к царству *Procariotae*, включающему истинные бактерии и сине-зеленые водоросли. Они, как правило, имеют больший размер, чем вирусы, и их, возможно, изучать в световой микроскоп. Основные характеристики бактерий: имеют в отличие от вирусов две нуклеиновые кислоты, менее выраженную специализацию органоидов (митохондрии и хлоропласты отсутствуют), не имеют ядерной мембраны;

рибосомы меньше, и в отличие от эукариот относятся к типу 70S; размножаются посредством бинарного деления (неполовым путем).

Грибы крупнее и имеют более сложную клеточную структуру, чем бактерии, генетический материал грибов отделен от цитоплазмы ядерной мембраной. Нитеподобные клетки грибов называют гифой. Размножение грибов происходит половым и бесполом (вегетативным) способом. Большинство патогенных грибов встречается в окружающей среде как природные сапрофиты. Вместе с тем дрожжи *Candida* часто обнаруживают в составе естественной кишечной микрофлоры.

Прионы (от *англ. proteinaceous infectious particle*, белково-подобная инфекционная частица, лишенная нуклеиновых кислот) – новый класс инфекционных агентов; имеют вид фибрилл размером 10-20x100-200 нм, массой 30 кД. Устойчивы к нагреванию, к действию протеаз, ультрафиолетовых лучей, ультразвука и ионизирующей радиации. В их состав входит идентифицированный белок Pr<sup>c</sup>, который кодируется в геноме клеток млекопитающих. Прионы резистентны к действию нуклеаз, однако инактивируются и возникают как продукты мутации собственного гена или при употреблении мяса животных, их содержащего. Частицы накапливаются в пораженном органе, не вызывая цитопатогенного действия, иммунного ответа и воспалительных реакций, и могут блокировать или активировать гены человека или животного, вызывая энцефалопатии и медленные инфекции – прионные инфекции. Прионовые белки потенцируют начало болезни Кройтцфельда-Якоба, синдрома Герстманна-Страусслера-Шайнкера, коровье бешенство и амиотрофического лейкоспонгиоза (атрофия и парез мышц), скрэпи, куру и др. [40, 41].

Вирусы имеют наименьший по размерам геном, облигатные внутриклеточные паразиты; содержат только один тип нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК; проходят через бактериальные фильтры и практически не доступны для изучения в световом микроскопе.

Способностью формировать биопленку обладают бактерии и грибы.

## 2.2 Классификация микроорганизмов

Классификация и систематика живых организмов представляют одну из наиболее сложных задач современной биологии. Все ныне существующие классификации животных и растений разнородны, противоречивы, ни одна из них не является полной, всеобъемлющей и принятой повсеместно. Причины этого явления следующие:

- до настоящего времени отсутствуют единые принципы и подходы к объединению (или разделению) в различные таксономические группы;
- очень многие микроорганизмы имеют одинаковые или близкие морфологические, биохимические, серологические и др. признаки и



разные свойства; родственные связи между многими бактериями точно не установлены, а эволюция не ясна;

- понятие «вид» есть основное для любой классификации, для бактерий до сих пор не имеет достаточно четкого определения;

- в ряде случаев генетическое родство между бактериями, установленное гибридизацией ДНК, соотношение А+Т и Г+Ц пар, спорно, т.к. оно лишь отражает общность происхождения.

В настоящее время существует два основных подхода к систематике (классификации) микроорганизмов:

1. Естественная классификация имеет конечной целью объединение близкородственных форм, связанных общностью происхождения, и установление иерархического соподчинения отдельных микроорганизмов.

2. Искусственная классификация, наоборот, объединяет организмы в группы на основе сходства их важнейших морфологических, биохимических, серологических, генетических и других свойств. Последнее часто используют для идентификации и определения микроорганизмов (пример искусственной систематики бактерий – определитель Берджи).

В основу классификации патогенных микроорганизмов положены их морфологические, биохимические, серологические, генетические и другие особенности.

В результате такого подхода выделяют три надцарства:

1. Archaea – одноклеточные микроорганизмы, не имеющие ядра, а также каких-либо мембранных органелл.

2. Bacteria – домен (надцарство) прокариотных (безъядерных) микроорганизмов,

3. Eukaryota – домен (надцарство) живых организмов, клетки которых содержат ядро.

Бактерии – одноклеточные микроорганизмы (прокариоты), имеющие клеточную стенку, лишённые хлорофилла, размножающиеся преимущественно путем деления клетки, неспособные к фотосинтезу. Оптимальными условиями жизнедеятельности подавляющего большинства клинически важных микроорганизмов является температура 30-40°C и pH в пределах 6,8-7,4 при достаточной влажности. Бактерии обладают способностью формировать биопленку. Выделяют типы бактерий и надтипы: *Acinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Fibrobacteres* и др.

Спирохеты – микроорганизмы, имеющие нитевидную спиральную форму, подвижны, их клеточная стенка представлена цитоплазматической мембраной, обладают способностью к формированию биопленки [42].

Актиномицеты – бактерии (прокариоты), образующие мицелий, в связи с чем занимающие промежуточное положение между бактериями и грибами, обладают способностью к формированию биопленки [43].

Риккетсии и хламидии – строгие внутриклеточные паразиты,

занимающие промежуточное положение между бактериями и вирусами и не растущие на питательных средах, биопленку не образуют.

Микоплазмы – микроорганизмы, не имеющие клеточной стенки, молликуты, паразитирующие вне клеток макроорганизма, и в отличие от вирусов растущие на искусственных питательных средах. Способны формировать биопленку [44].

В основе современной классификации бактерий лежит принцип нумерической таксономии (также используют термины компьютерная таксономия, таксометрия, адансоновская таксономия), которая опирается на количественную оценку степени сходства и различия организмов (требуется изучить большое количество признаков – фенотип). На основе подобия изолятов (подсчета коэффициентов или процентного сходства) по биохимическим, морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам объединяют изоляты в группы и определяют вид микроорганизма. Однако методы, основанные на определении фенотипического подобия, имеют много недостатков:

- различные гены могут определять продукцию ферментов, расщепляющих субстраты, со сходной активностью;
- возможны негативные реакции, которые связаны с низкой чувствительностью методик определения ферментной активности, а также супрессивной мутацией, наличием не функционирующих генов;
- плазмиды бактерий могут в определенной степени функционально замещать гены генома и проявлять признаки, несвойственные данному виду;
- прокариоты обладают выраженной генетической изменчивостью, что приводит к их фенотипическим различиям.

На основе нумерического подхода для облегчения быстрой идентификации микроорганизмов разработаны разнообразные доступные и ускоренные биохимические тесты. На основе последних промышленность выпускает тест-системы для идентификации микроорганизмов по их субстратному профилю, с обработкой результатов на компьютере.

## **2.3 Основные свойства бактерий, лежащие в основе их идентификации**

### *2.3.1 Тинкториальные свойства*

Окраска по Граму. За счет различий строения клеточной стенки выделяют грам(+) и грам(-) микроорганизмы.

Грамположительные грам(+) бактерии хорошо удерживают комплекс кристаллического фиолетового с йодом и устойчивы к обесцвечиванию спиртом за счет сокращения клеточной стенки, содержащей большое количество пептидогликана, и окрашиваются в синий или фиолетовый цвет. Однако бактерии из старых колоний или в толстых мазках могут

окрашиваться неравномерно.

Грамотрицательные грам(-) бактерии обесцвечиваются этанолом и хорошо докрашиваются фуксином или сафронином, соответственно, в красный и желтый цвет.

Кислотоустойчивые бактерии содержат большое количество жирных кислот. Поэтому для их определения обычно применяют окраску по Циллю-Нильсену, преимущественно для идентификации видов рода *Mycobacterium* и *Nocardia*.

Окраска по Циллю-Нильсену включает обработку нагретым карболовым фуксином (бактерии окрашиваются в красный цвет); затем образцы обесцвечивают подкисленным спиртом и окрашивают метиленовым синим (кислотоустойчивые бактерии выглядят красными на светло-голубом фоне). Некислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в синий цвет. Во многих методах окраска с использованием конго красного, генциан-фиолетового, карболового фуксина и др. используется для определения способности микроорганизмов формировать биопленки.

### 2.3.2 Морфологические признаки

Морфология бактерий (размеры, формы и т.д.) также является существенным фактором для идентификации микроорганизмов. Однако у многих бактерий часто встречаются изменчивые формы. Особенно частое изменение морфологии наблюдается при изучении клинических изолятов, подвергающихся действию антибиотиков и антисептиков, что существенно снижает значимость морфологических признаков.

### 2.3.3 Метаболическая активность

Метаболическая активность является важным диагностическим признаком, основной из них – потребность в кислороде.

По типу дыхания все микроорганизмы разделяются на:

Аэробные бактерии (строгие аэробы), используют молекулярный  $O_2$  в качестве конечного акцептора электронов в процессе дыхания; большинство из них обладает мембраносвязанной цитохром-С-оксидазой, играющей ведущую роль в электрон-транспортной цепи (для определения активности фермента применяют оксидазный тест). Аэробные микроорганизмы (например, *Pseudomonas aeruginosa*) не могут делиться и расти в отсутствие молекулярного кислорода, так как они его используют в качестве акцептора электронов.

Анаэробные бактерии (облигатные анаэробы), не используют молекулярный  $O_2$  в качестве конечного акцептора электронов; анаэробы (например, *Fusobacterium nucleatum*) способны расти только в отсутствие свободного кислорода воздуха ( $10^{-5}$  атмосфер); данные бактерии получают энергию либо в процессе брожения (различают спиртовое, молочнокислое, уксуснокислое, муравьинокислое, маслянокислое и пропионовокислое

брожение), где конечными акцепторами электронов служат органические соединения, либо при анаэробном дыхании, используя отличный от кислорода акцептор электронов (например,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^-$  или  $\text{Fe}^{3+}$ ). При наличии свободного кислорода анаэробы погибают в течение 5 мин., т.к. у них отсутствует фермент каталаза, способный расщеплять  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Факультативные анаэробы, могут получать энергию либо в процессе дыхания (терминальный акцептор  $\text{O}_2$ ), либо при брожении в зависимости от условий среды (например, *S.aureus*, *E.coli* могут расти как в присутствии кислорода, так и без него); образуют АТФ при окислительном и субстратном фосфорилировании.

Микроаэрофилы, хорошо растут только при сниженном парциальном давлении кислорода. Принято делить на микроаэрофильные аэробы – лучше культивируются при содержании  $\text{O}_2$  ( $\leq 5\%$ ), и микроаэрофильные анаэробы – способны хорошо расти в анаэробных и микроаэрофильных условиях. Многие из микроаэрофилов являются капнофилами.

Капнофильные микроорганизмы, представляют собой бактерии, хорошо растущие только в присутствии повышенных концентраций углекислого газа (около 5-10%). Например, бактероиды, фузобактерии, гонококки и др.

На сегодняшний день известно, что способность формировать биоплёнки характерна как для аэробов, так и для анаэробов (*C. difficile* и др.). Тем не менее, в пределах одной биопленки создаются условия, подходящие и для анаэробов, и для аэробов, а также могут присутствовать микроорганизмы со сниженным метаболизмом.

#### 2.3.4 Серологические свойства

Структурные особенности бактерий распознаются специфическими антисыворотками как антигенные детерминанты. Антигенными свойствами обладают многие компоненты оболочки: пептидогликан, тейхоевые кислоты, белок А стафилококка, протеин G стрептококка, капсула и т.п. Среди инфекционных антигенов (бактерий, вирусов грибов простейших) различают:

- группоспецифичные, встречаются у микроорганизмов представителей разных родов и семейств;
- родоспецифичные, выявляются у всех представителей данного рода;
- видоспецифичные, выявляются у всех представителей данного вида;
- тип-, или сероваро-, или изолятоспецифичные, встречаются у представителей различных подгрупп (изолятов) внутри одного вида.

В литературе встречается информация о выработке специфичных антител к компонентам биопленки, что требует дальнейшего изучения [45].

### 2.3.5 Генетическое родство

Наиболее информативным показателем для филогенетической классификации бактерий является их генетическое родство. При систематизации бактерий на основе генетического родства обычно учитывают следующие характеристики:

1. Способность обмениваться генетической информацией посредством трансдукции, трансформации или конъюгации, которая возможна только между близкородственными микроорганизмами.

2. Состав нуклеотидных оснований (отношение Г-Ц и А-Т пар). Химическими методами после гидролиза ДНК и разделения свободных оснований можно определить нуклеотидный состав и определить точку плавления ДНК, при которой происходит ее денатурация в результате разрыва водородных связей, соединяющих две цепи. В группе прокариот наблюдается колебания содержания Г-Ц от 30 до 75 мол.%, но среднее содержание Г-Ц у изолятов одного вида очень близкое. Однако в некоторых случаях два организма с одинаковым средним нуклеотидным составом ДНК могут принадлежать к различным таксономическим группам [46, 47].

3. Гомология нуклеиновых кислот для бактерий, определяется методом гибридизации и является «золотым стандартом» в определении степени родства среди бактерий. Однако приобретение в результате мутаций и генетических рекомбинаций новых признаков делает такой подход к систематике не всегда удобным на практике.

Метод гибридизации нуклеиновых кислот, позволяет наиболее точно оценить генетическую гомологию изолятов. После быстрого охлаждения раствора ДНК, подвергнутого тепловой денатурации, ее одиночные цепи остаются разделенными. При температуре ниже  $t$  плавления на 10-30°C наступает специфическая реассоциация и «отжиг» комплементарных цепей с образованием двухцепочечных молекул. Поэтому при смешивании и обработке препаратов ДНК из двух близкородственных изолятов бактерий образуются молекулы гибридной ДНК. Один из изолятов бактерий (эталон) выращивают в среде, содержащей дейтерий ( $D_2O$ ), и, следовательно, его ДНК становится тяжелей. Другой изолят культивируют на обычной питательной среде, не содержащей изотоп. После проведения гибридизации гибридные молекулы ДНК можно обнаружить путем ультрацентрифугирования препарата в градиенте  $CsCl$ .

Метод центрифугирования в градиенте плотности  $CsCl$ , слишком трудоемок. Более простой метод – это использование образцов ДНК с радиоактивной меткой – метод молекулярных зондов [47]. Последний представляет собой плазмидную ДНК с интегрированными в нее фрагментами специфической ДНК, меченными радиоактивной меткой. Меченый зонд вместе с исследуемым материалом наносится на мембранный фильтр, фотографируется, после чего определяется степень его гомологии со стандартной ДНК. Метод позволяет быстро определить

наличие в исследуемом материале искомой ДНК и идентифицировать микроорганизмы при наличии достаточного количества материала. Как развитие этого метода предлагается использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР), которая также относится к генетическим методам. ПЦР может быть использована для идентификации микроорганизмов в составе БП, а также позволяет выявить генетические маркеры биопленки [48].

### 2.3.6 Принципы систематизации бактерий в определителе Берджи

В таксономии микроорганизмов (табл. 2.1) международное признание получил определитель бактерий, изданный Д. Берджи, который неоднократно переиздавался [49].

Таблица 2.1 – Наиболее важные бактерии, вызывающие инфекционные заболевания у человека, и вероятность формирования ими биопленок

Род		Вид	Вероятность формировать БП
Бактерии			
Грам(+) кокки			
Семейство <i>Micrococcaceae</i>			нет информации
<i>Micrococcus</i>			
<i>Stomatococcus</i>		<i>mucilaginosus</i>	
Семейство <i>Staphylococcaceae</i>			
<i>Staphylococcus</i>	КПС	<i>aureus</i> , <i>aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> ( <i>intermedius</i> , <i>delphini</i> , <i>hyicus</i> у животных)	50-75%
	КОС	<i>arlettae</i> , <i>auricularis</i> , <i>caprae</i> , <i>capitis</i> , <i>capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i> , <i>carnosus</i> , <i>caseolyticus</i> , <i>chromogenes</i> , <i>cohnii</i> , <i>cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i> , <i>epidermidis</i> , <i>equorum</i> , <i>haemolyticus</i> , <i>hominis</i> , <i>gallinarum</i> , <i>kloosii</i> , <i>lentus</i> , <i>lugdunensis</i> , <i>saccharolyticus</i> , <i>saprophyticus</i> , <i>schleiferi</i> , <i>simulans</i> , <i>xylosus</i> , <i>xylosus</i> subsp. <i>simulans</i> , <i>warneri</i>	до 93%
<i>Gemella</i>		<i>haemolysans</i> , <i>morbilorum</i>	до 99%
Семейство <i>Streptococcaceae</i>			
<i>Lactococcus</i>		<i>lactis</i> , <i>cremoris</i>	до 96%
<i>Streptococcus</i>	β-гемолизические	<i>pyogenes</i> (серогруппа А); <i>agalactiae</i> (В); <i>equi</i> (С); <i>equisimilis</i> (С); <i>zooepidemicus</i> (С); <i>anginosus</i> (А, С, F, G или нет)	до 99%
	не β-гемолизические	<i>pneumoniae</i> ( <i>pneumococcus</i> ); <i>agalactiae</i> , <i>bovis</i>	до 90%
	α-гемолизические (зеленящие)	группы: <i>mutans</i> (включает виды: <i>cricketus</i> , <i>downei</i> , <i>ferus</i> , <i>macace</i> , <i>rattus</i> , <i>sorinus</i> ); <i>mitis</i> ( <i>mitior</i> , <i>oralis</i> , <i>sanguis</i> биотип II); <i>salivarius</i> ( <i>intestinalis</i> , <i>vestibularius</i> ); <i>sanguis</i> ( <i>gordonii</i> ); <i>anginosus</i> ( <i>intermedius</i> , <i>constellatus</i> , <i>milleri</i> )	до 99%
Семейство <i>Peptococcaceae</i>			до 90%
<i>Peptococcus</i>		<i>niger</i>	
Семейство <i>Peptostreptococcaceae</i>			нет информации
<i>Peptostreptococcus</i>			

Род	Вид	Вероятность
Семейство <i>Aerococcaceae</i>		до 37%
<i>Aerococcus</i>	<i>viridans</i>	
Семейство <i>Enterococcaceae</i>		75-100%
<i>Enterococcus</i>	<i>avium, casseliflavus, durans, faecalis, faecium, gallinarum, hirae, malodoratus, mundtii, pseudoavium, raffinosus, solitarius</i>	
Семейство <i>Leuconostocaceae</i>		до 90%
<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum, cremoris, dextranicus, lactis, mesenteroides, pseudomesenteroides, paramesenteroides</i> (значение в патологии человека не ясно, но чаще выделяют при инфекциях у пациентов с иммунодефицитами, при злокачественных новообразованиях, длительной катетеризации, из интраабдоминальных абсцессов, абсцессов печени, из раневого отделяемого при послеоперационных инфекциях).	
Семейство <i>Lactobacillaceae</i>		до 90%
<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici, damnosus, dextrinicus, parvulus, pentosaceus, urinequi</i>	
<i>Lactobacillus</i>		
Семейство <i>Neisseriaceae</i>		нет информации
<i>Neisseria</i>	<i>cinerea, elongata, flavescens, gonorrhoeae, lactamica, meningitidis, polysaccharea, mucosa, subflava</i>	
Семейство <i>Moraxellaceae</i>		нет информации
<i>Moraxella</i>	<i>lacunata, bovis, equi</i>	
<i>Acinetobacter</i>	<i>Baumanii, haemolyticus</i>	
Семейство <i>Acidominococcaceae</i>		нет информации
<i>Acidominococcus</i>		
<i>Veillonella</i>	<i>parvula; spp.</i>	
Грам(-) палочки		
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>		до 100%
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii, koseri, farmeri</i>	
<i>Salmonella</i>	<i>enterica, bongori</i>	
<i>Shigella</i>	<i>boydii, dysenteriae, flexneri, sonnei</i>	
<i>Klebsiella</i>	<i>oxytoca, pneumonia, planticola</i>	
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae, sakazakii, aerogenes</i>	
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	
<i>Proteus</i>	<i>mirabilis, vulgaris</i>	
<i>Providencia</i>	<i>rettgeri, alcalifaciens, stuartii</i>	
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>	
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica, pestis, pseudotuberculosis</i>	

Род		Вид		Вероятность	
Семейство <i>Pseudomonadaceae</i>				до 100 %	
<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa, fluorescens, putida</i>				
Семейство <i>Vibrionaceae</i>				до 100%	
<i>Vibrio</i>	<i>cholera, parahaemolyticus</i>				
Семейство <i>Campylobacteraceae</i>				нет информации	
<i>Campylobacter</i>	<i>fetus, coli</i>				
Семейство <i>Helicobacteraceae</i>				до 97%	
<i>Helicobacter</i>	<i>pylori</i>				
Семейство <i>Legionellaceae</i>				73-85%	
<i>Legionella</i>	<i>pneumophila</i>				
Семейство <i>Brucellaceae</i>				нет информации	
<i>Brucella</i>	<i>abortus, melitensis</i>				
Семейство <i>Pasteurellaceae</i>				нет информации	
<i>Haemophilus</i>	<i>influenzae, parainfluenzae, ducrey</i>				
<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>				
<i>Actinonacillus</i>					
Семейство <i>Francisellaceae</i>				нет информации	
<i>Francisella</i>	<i>tularensis</i>				
Семейство <i>Bifidobacteriaceae</i>				нет информации	
<i>Bifidobacterium</i>					
<i>Gardnerella</i>	<i>vaginalis</i>				
Семейство <i>Bacteroidaceae</i>				до 90%	
<i>Bacteroides</i>	<i>asaccharolyticus, fragilis, melaninogenicus, oralis, vulgatis</i>				
Семейство <i>Fusobacteriaceae</i>					
<i>Fusobacterium</i>	<i>freundii, nucleatum, varium</i>			до 99%	
<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>			до 90%	
Грам(+) палочки					
Семейство <i>Bacillaceae</i>					
<i>Bacillus</i>	Группа 1	Подгруппа А	<i>megaterium</i>		нет информации
			<i>B. cereus</i> «group»	<i>antracis, cereus, cereus var. mycoides, thuringiensis</i>	
	Подгруппа В	<i>coagulans; firmus; licheniformis; pumilus; subtilis</i>			
	Группа 2	<i>alvei; brevis; circulans; laterosporus; macerans; polymyxa; stearothermophilus;</i>			
	Группа 3	<i>sphaericus</i>			
Семейство <i>Clostridiaceae</i>					
<i>Clostridium</i>	<i>botulinum; difficile; histolyticum, perfringens, septicum, tetani</i>			15-20%	
<i>Sarcina</i>					
Семейство <i>Corynebacteriaceae</i>					
<i>Corynebacterium</i>	<i>diphtheriae, ulcerans, pseudotuberculosis, xerosis, striatum, kutcheri, renale group, pseudodiphtheriticum; группа JK (включая</i>			до 90%	



Род	Вид	Вероятность
	<i>jeikeium</i> ), <i>minutissimum</i> , <i>mycetoides</i> , <i>aquaticum</i> , <i>genitalium</i> , <i>pseudogenitalium</i> , <i>bovis</i> , <i>matruchotii</i>	
Семейство <i>Listeriaceae</i>		до 90%
<i>Listeria</i>	<i>ivanovii</i> , <i>innocua</i> , <i>grayi</i> , <i>monocytogenes</i> , <i>murrayi</i> , <i>seeligeri</i> , <i>welshimeri</i> ,	
Актиномицеты Семейство <i>Actinomycetaceae</i>		до 50%
<i>Actinomyces</i>	<i>israelii</i>	
Семейство <i>Nocardiaceae</i>		нет информации
<i>Nocardia</i>	<i>asteroides</i> , <i>brasiliensis</i> , <i>otitidiscaviarum</i>	
<i>Rhodococcus</i>	<i>spp.</i> , <i>aurantiaca</i> , <i>equi</i>	
Семейство <i>Streptomycetaceae</i>		нет информации
<i>Streptomyces</i>	<i>somaliensis</i> , <i>spp.</i>	
Семейство <i>Nocardiopsaceae</i>		нет информации
<i>Nocardiopsis</i>	<i>spp.</i>	
Семейство <i>Thermomonosporaceae</i>		нет информации
<i>Actinomadura</i>	<i>spp.</i>	
Семейство <i>Mycobacteriaceae</i>		нет информации
<i>Mycobacterium</i>	<i>africanum</i> , <i>aquae</i> , <i>asiaticum</i> , <i>avium-intracellulare</i> , <i>bovis</i> , <i>chelonae</i> , <i>flavescens</i> , <i>fortuitum</i> , <i>gastri</i> , <i>gordoniae</i> , <i>haemophilum</i> , <i>kansasii</i> , <i>leprae</i> , <i>malmoense</i> , <i>marimum</i> , <i>nonchromogenicum</i> , <i>phlei</i> , <i>scrofulaceum</i> , <i>simiae</i> , <i>smegmatis</i> , <i>szulgai</i> , <i>terrae</i> , <i>triviale</i> , <i>tuberculosis</i> , <i>vaccae</i> , <i>ulcerans</i> , <i>xenopi</i>	
Спирохеты Семейство <i>Spirochaetaceae</i>		нет информации
<i>Spirocheta</i>		
<i>Treponema</i>	<i>pallidum</i>	
<i>Borrelia</i>	<i>anseria</i> , <i>burgdorferi</i> , <i>recurrentis</i>	
Семейство <i>Leptospiraceae</i>		
<i>Leptospira</i>	<i>interrogans</i>	
Риккетсии и Хламидии Семейство <i>Coxiellaceae</i>		нет информации
<i>Rickettsia</i>	<i>conori</i> , <i>orientalis</i> , <i>prowazekii</i> , <i>rickettsii</i> , <i>typhi</i>	
<i>Coxiella</i>	<i>burnetti</i>	
Семейство <i>Chlamydiaceae</i>		
<i>Chlamydia</i>	<i>pneumoniae</i> , <i>psittaci</i> , <i>trachomatis</i>	
Микоплазмы Семейство <i>Mycoplasmataceae</i>		>60%
<i>Mycoplasma</i>	<i>hominis</i> , <i>pneumoniae</i>	
<i>Ureaplasma</i>	<i>urealyticum</i>	

## 2.4 Основы генетики микроорганизмов

### 2.4.1 Особенности организации генетического аппарата микроорганизмов

У бактерий генетический материал представлен двойной спиралью ДНК, состоящей из 2-х комплементарных полинуклеотидных цепочек.

Структура бактериальной клетки, способная к самовоспроизведению, получила название «репликон» [50]. Бактерии могут содержать несколько генетических элементов, способных к репликации.

Репликоны бактерий представлены нуклеоидом, плазмидами и эписомами.

Плазмиды представляют собой ДНК, которая находится в цитоплазме бактериальной клетки.

Эписомы могут находиться как в свободном состоянии в цитоплазме бактерий, так и быть интегрированными в нуклеоид.

Нуклеоид бактерий представляет собой замкнутую кольцевидную хромосому, располагающуюся в цитоплазме, и содержит несколько тысяч отдельных генов. В бактериальной клетке может одновременно находиться от одного до четырех копий нуклеоида.

Существуют несколько основных способов репликации нуклеоида [51]. Тета-тип – репликация молекулы ДНК начинается в определенной точке ее кольца и приводит к образованию «вздутия», которое распространяется в двух направлениях. В результате образуются две дочерние кольцевые хромосомы.

Сигма-тип – реализуется во время конъюгации, кольцевая бактериальная хромосома превращается в линейную по механизму «катящегося колеса».

Единицей наследственности у всех живых организмов являются гены, которые способны к саморепликации. Они отвечают за последовательность аминокислот в синтезируемой белке, которая определяется последовательностью нуклеотидов в гене.

Генотип микроорганизма – это совокупность генов данной особи, которые реализуют генотип через его взаимодействие с окружающей средой. В результате ген может экспрессироваться или подавляться.

Фенотип микроорганизма – набор его морфологических, биохимических, серологических и др. признаков.

Гены, ответственные за синтез фермента у бактерий, обозначают строчными буквами латинского алфавита со знаком «+». Например, *glu*<sup>+</sup> – ген, ответственный за расщепление глюкозы. Гены, обеспечивающие устойчивость к антимикробным препаратам, обозначают буквой *r* (*resistant* – устойчивый). Например, резистентность к гентамицину обозначается как *gen*<sup>r</sup>, а чувствительность соответственно – *gen*<sup>s</sup> [51].

Различают также:

- структурные гены, отвечают за синтез белков-ферментов, обеспечивают протекание биохимических реакций;
- гены-регуляторы, отвечают за синтез белковых веществ, могут являются репрессорами и изменять функционирование структурных генов;
- гены-промоторы, представляют собой участок ДНК, который распознается ДНК-зависимой РНК-полимеразой, необходимы для начала транскрипции;
- гены-операторы, являются посредниками, которые располагаются между структурными генами, промотором и генами-регуляторами. При появлении в среде вещества-индуктора, которое связывает репрессор, блок со структурных генов снимается, и они становятся функциональными.

Ген-регулятор, промотор, оператор и структурные гены совместно образуют оперон, который отвечает за экспрессию одного или группы генов [51].

#### 2.4.2 Внехромосомные факторы наследственности (плазмиды и эписомы)

Плазмиды имеют ДНК, представляющую собой кольцевидную структуру, их наличие не обязательно в клетке, при их наличии клетка приобретает новые свойства (например, устойчивость к антибиотикам). В одной бактериальной клетке может быть несколько неродственных плазмид, которые сходны по структуре, т.к. системы их репликации совершенно различны и не мешают друг другу [52, 53].

По способности передаваться из одной клетки в другую плазмиды делятся на конъюгативные (трансмиссивные) и неконъюгативные (нетрансмиссивные, которые при делении бактерии утрачиваются, если нет других факторов передачи).

Конъюгативные плазмиды содержат *tra*-оперон (англ. *transfer* - перенос) и обеспечивают процесс конъюгации. Они способствуют синтезу на поверхности клеток специфических ворсинок (секс-пилей).

Различают следующие виды плазмид:

F-фактор – фактор фертильности.

Col-фактор – колициногенный фактор или фактор бактериоциногении (например, у стафилококка – стафилоцин).

R-фактор отвечает за устойчивость к антимикробным препаратам. R-плазмида попадает в реципиентную клетку и приносит фактор переноса и гены устойчивости к антимикробным препаратам, которые чаще всего представляют собой транспозоны.

Плазмиды, обеспечивающие патогенные свойства бактерий, – плазмиды Ent, Hly, K и т.д.

Ent-плазмиды содержат в своем составе *tox*-гены, которые кодируют образование энтеротоксинов у энтеробактерий. Плазмида K88 содержит гены, отвечающие за синтез вещества капсулы бактерий.

Плазмида Hly ответственна за синтез гемолизинов у энтеропатогенных микробов и стрептококков.

Умеренные фаги несут дополнительную информацию для бактериальной клетки и часто определяют ее патогенность за счет переноса, например, генов, ответственных за токсинообразование (дифтерийные бактерии, *C. difficile* и др.).

В условиях биопленки возможность обмена генной информации значительно повышается, что способствует более быстрому приспособлению клеток к факторам внешней среды. Биоплёнки идеально подходят для обмена генетического материала различного происхождения.

Доказана роль конъюгативной F плазмиды кишечной палочки в формировании БП. В случае F и других плазмид, подобных ей, экспрессирующих фимбрии, появление плазмиды связано с повышенным образованием биопленок. Добавление F-типа конъюгативной плазмиды, R1drd19, способствует активному образованию биопленки *E.coli* [54]. Присутствие плазмиды R1drd19 также способствует экспрессии многочисленных хромосомных генов, ответственных за формировании БП. Плазмида pOLA52 способна индуцировать образование биопленки *Salmonella typhimurium* и *Enterobacter aerogenes* [55]. Исследования TOL конъюгативной плазмиды *Pseudomonas putida* показало, что ее передача также может привести к увеличению образования БП за счет увеличения количества внеклеточной ДНК, тем самым способствуя образованию матрикса биопленки [56].

#### 2.4.3 Инсерционные (Is) последовательности и транспозоны

У бактерий встречаются также структурные компоненты подобные ДНК: Is-последовательности и транспозоны, которые относятся к мигрирующим генетическим элементам и могут кодировать свой собственный перенос (транспозицию) от одного нуклеоида к другому или между нуклеоидом и плазмидами [40, 51].

Is-элементы (от англ. *insertion* – вставка, *sequence* – последовательность) не обнаружены в свободном состоянии, могут перемещаться по геному, обеспечивая взаимодействие между нуклеоидом, плазмидами и эписомами. При этом происходит репликация Is-элемента, при которой копия встраивается в мишень.

Транспозоны – более сложно устроенные генетические элементы, состоящие из 2500-20000 и более пар нуклеотидов, могут находиться в свободном состоянии в виде кольцевой молекулы. Они могут перемещаться из хромосомы в плазмиды и наоборот. ДНК транспозонов имеет на обоих концах последовательности ДНК, напоминающие Is-элементы. Транспозоны несут гены, ответственные за синтез бактериальных токсинов и ферментов.

#### 2.4.4 Изменчивость

Различают 2 типа изменчивости: фенотипическую (ненаследственную, модификационную) и генотипическую (наследственную).

Фенотипическая изменчивость является ненаследуемой и возникает под действием изменяющихся факторов внешней среды и позволяет популяциям бактерий быстро адаптироваться к факторам окружающей среды.

Модификации – стабильные или кратковременные изменения проявления признаков, не сопровождающиеся изменениями ДНК бактерий, представляют собой временное изменение и поддерживаются пока действует вызвавший их фактор.

Мутации – это изменения структуры ДНК генов.

Факторы, вызывающие мутации, называются мутагенами (могут быть химической, физической и биологической природы).

Мутации подразделяются на генные – изменения в пределах 1 гена, хромосомные – изменения более чем в одном гене, точковые – в паре оснований нуклеотидов.

По расположению мутации подразделяются на нуклеоидные и цитоплазматические (происходят в плазидах).

По направлению различают прямые и обратные мутации. Прямые – происходят изменения бактерий «дикого», т.е. природного типа. При обратных мутациях происходит возврат от измененного типа к «дикому».

По фенотипическим последствиям различают нейтральные мутации – не проявляются фенотипически; условно-летальные и летальные.

В результате мутаций у бактерий могут изменяться самые различные свойства: вирулентность, чувствительность к антибиотикам, биохимические свойства и т.п. [41].

Бактерии в биопленки часто демонстрируют мутантный фенотип [57] и фенотипические изменения [58], что указывает на значимую роль мутаций и генетической дестабилизации в развитии биопленки. Факторы, влияющие на развитие высоких частот мутаций в популяциях бактерий являются предметом особого недавнего интереса [59]. Исследования выявили роль окислительного стресса в формировании мутации и фенотипической изменчивости среди БП бактерий [60, 61].

Диссоциация представляет собой особый, присущий только бактериям вид изменчивости, при котором в пределах одного вида происходит расщепление на S- и R-формы микроорганизмов [40, 47].

S-формы (англ. *smooth* – гладкий) чаще вирулентны, обладают хорошо выраженными антигенными свойствами, имеют капсулу, биохимически высоко активны, на средах дают рост мелких блестящих колоний. R-формы (англ. *rough* – грубый, неровный) наоборот реже вирулентны, не имеют капсулы, биохимически менее активны, колонии крупные, шероховатые. Некоторые микроорганизмы, например, бактерии

сибирской язвы, возбудители туберкулеза, чумы более вирулентны в R-форме.

Как правило, диссоциация протекает в одном направлении: от S- к R-форме, иногда через промежуточные стадии образования слизистых колоний.

Причина диссоциации – мутации, возникающие после встраивания внехромосомных факторов наследственности в бактериальную хромосому, когда нарушается функция оперонов и изменяется синтез липополисахаридов клеточной стенки микроба (образуется R-форма).

Репарации – изменения генетического кода, возникающие в результате мутаций, ведут к нарушению структуры и функции бактериальных клеток и часто являются летальными [40, 51].

Системы репарации состоят из многочисленных ферментов, контролирующих состояние ДНК. Система фотореактивации активизируется при образовании тиминовых димеров в ДНК под действием ультрафиолетового облучения. Ферменты в присутствии видимого света деполимеризуют тиминовые димеры до исходных мономеров.

Темновая репарация действует аналогично в отсутствие видимого света. Различают отличающиеся по механизмам системы дорепликативной и пострепликативной репарации.

Первая выявляет повреждение участков и вырезает их эндонуклеазами с последующим удалением. После чего осуществляет синтез поврежденной цепи по сохранившейся матрице и сшивает участки ДНК-лигазой. Пострепликативная репарация обеспечивает замещение поврежденных участков после репликации.

SOS-ответ (репарация) возникает в ответ на резкую остановку синтеза нуклеиновых кислот и контролируется у микробов так называемой SOS-областью (или *SOS-регулоном*). В критические моменты возникает взрыв генетических процессов, возрастает частота мутаций как точечных, так и по типу сдвига рамки считывания, увеличивается частота хромосомных перестроек, возрастает частота рекомбинационных обменов и становится возможной запрещенная межвидовая рекомбинация [41, 51].

Задача SOS-индуцированного мутагенеза – заставить ДНК-полимеразу пройти повреждение любой ценой. Считается, что горизонтальный, даже межвидовой перенос генов, играет важную роль в эволюции бактерий [40, 51].

#### 2.4.5 Рекомбинационная (комбинативная) изменчивость

Рекомбинация у бактерий – это перенос генетического материала из клетки-донора в клетку-реципиента (от одного репликона к другому). В результате происходит быстрый обмен генетической информацией между отдельными бактериями [47, 52].

У бактерий различают 3 основных способа – трансформация, трансдукция и конъюгация.

Трансформация – происходит за счет переноса генетической информации из донорской клетки в реципиентную. ДНК образуется искусственно (в эксперименте) или освобождается при лизисе клетки в естественных условиях. Путем трансформации можно передать: устойчивость к антибиотикам, устойчивость к сульфаниламидным препаратам, способность синтезировать различные аминокислоты, капсулообразование.

Трансформация проходит за несколько этапов.

Вначале – адсорбция донорской ДНК на поверхности реципиентной клетки. Затем – донорская ДНК проникает в реципиентную клетку с активным обменом веществ, которая находится в стадии «компетентности» (т.е. имеет особый белок – «фактор компетентности»). Далее с помощью ферментов рекомбиназ происходит специфическое взаимодействие и встраивание ДНК донора в ДНК реципиента [47]. Половина проникшей ДНК разрушается, другая превращается в однонитчатую. ДНК донорской клетки включается в ДНК реципиента, где есть однонитчатые разрывы, и образуются участки гибридной двойной спирали ДНК. Трансформация завершается репликацией ДНК реципиента и образованием клетки с новыми свойствами. Таким образом, передается обычно один ген, который не превышает 1/100 длины нуклеотида.

Установлено, что «компетентность» бактерий в составе биопленки находится под контролем Quorum sensing. Медиаторы Quorum sensing продуцируются клетками биопленки и выделяются в окружающий их матрикс. Когда концентрация этих медиаторов достигает критического значения начинается захват внеклеточной ДНК и транскрипция неактивных генов. В незрелых БП наблюдается наибольшая скорость трансформации. В эксперименте с биопленкой, образуемой *Streptococcus mutans* показано, что трансформация бактерий в антибиотикорезистентный изолят может происходить путем добавления чистой ДНК или путем разрушения донорских клеток, несущих ген резистентности [62].

Трансдукция – перенос генетического материала из клетки донора в клетку реципиента через трансдуцирующий, умеренный бактериофаг. Бактериофаг получает участок ДНК из донорской клетки за счет неточной репликации своего генома из клетки донора.

Существуют 3 вида трансдукции:

Неспецифическая трансдукция – в реципиентную клетку попадает любой ген донорской клетки.

Специфическая трансдукция, когда бактериофаг переносит строго определенный участок ДНК от клетки донора к реципиенту и встраивает его в строго определенный участок генома.

Абортивная трансдукция, когда гены не включаются в ДНК реципиента и остаются в цитоплазме в виде плазмиды, а новый признак по

мере деления клетки исчезает. Существуют публикации, указывающие на экспрессию в биоплёнках генов, характерных передаче генной информации с помощью бактериофагов. Однако прямых примеров трансдукции до настоящего времени не наблюдали.

Конъюгация – передача генетического материала при непосредственном контакте клеток через цитоплазматический мостик из клетки донора в клетку реципиента [63]. Генетический материал передается в виде плазмид (кольцевой двуспиральный участок ДНК), содержащие до 100 генов. В этих участках может быть кодировано образование  $\beta$ -лактамазы, инактивирующей пенициллина и цефалоспорины, и ферментов, разрушающих аминокликозиды. Такие плазмиды называются R-плазмидами.

Донорские клетки содержат F-плазмиду (фактор фертильности, ответственный за конъюгацию, половой фактор). Реципиентные клетки не содержат полового фактора, могут приобрести его в процессе конъюгации. F-фактор всегда содержит *tra*-оперон, который и обеспечивает процесс конъюгации за счет образования половых ворсинок – «секс-пилей» и формирование конъюгационной трубки. Белки половых ворсинок распознают реципиентную клетку и обеспечивают образование цитоплазматического мостика.

Процесс конъюгации происходит по типу «катящегося колеса». По конъюгационной трубке линейная копия F-фактора переходит в клетку-реципиент, и последняя приобретает свойства донора.

Если F-фактор интегрируется в хромосому клетки-донора, то такая бактерия называется Hfr-клетка (англ. high frequency of recombination – высокая частота рекомбинации). В процессе конъюгации происходит репликация генома Hfr-клетки по типу «катящегося колеса» со встроенным F-фактором. Передача генов начинается у F-фактора, и ДНК F-фактора передается последней. Конъюгационная трубка длинная и непрочная, поэтому полный перенос копии ДНК донора происходит относительно редко и F-фактор остается в донорской клетке, но клетка-реципиент получает гены из нуклеоида бактерии-донора [40].

Ранее было показано, что скорость передачи плазмид, содержащих ген резистентности к тетрациклину, у *E. faecalis* происходит до 100 раз быстрее в БП по сравнению с планктонными формами, причем наибольшая эффективность передачи наблюдалась в молодых БП, при взрослении биоплёнки наблюдалось снижение скорости конъюгации [64].

#### 2.4.6 Генетические основы патогенности микроорганизмов

Основными факторами являются ферменты агрессии и инвазии, адгезины, капсула, токсины. Большая часть из них кодируется непосредственно генами нуклеоида (например, капсулы), а другая часть – плазмидами и эписомами [40, 52]. На сегодняшний день идет активное изучение генов, ответственных за формирование микробного сообщества –



био пленки. В последние годы выяснилось, что существенную роль в регуляции образования био пленок играет c-di-GMP – циклический ди-гуанозин-монофосфат, участвующий в регуляции синтеза экзополисахарида био пленок. Гены, ответственные за синтез и разрушение c-di-GMP, имеются, по-видимому, у всех прокариотов, но отсутствуют у высших эукариотов [65].

У бактерий в био пленках изменяется экспрессия почти 40 % бактериальных генов, участвующих в процессах мембранного транспорта, секреции, синтеза фосфолипидов и липополисахарида, регуляции генов. При этом может происходить как активирование экспрессии указанных генов, так и их репрессия, что влияет на патогенность микроорганизмов в составе био пленки.

Распространение и передача генов вирулентности среди бактерий осуществляется различными путями [66]. Фаговая (лизогенная конверсия) – путь, когда клетка становится вирулентной только при наличии в геноме профага, кодирующего факторы вирулентности (например, токсины). Другой механизм – конъюгация, самый распространенный механизм передачи генов, ответственных за патогенность у бактерий.

#### 2.4.7 Генетические основы патогенности био пленки

Так как большинство популяции бактерий окружены экстрацеллюлярной ДНК [28], она может выступать в качестве субстанции, поддерживающей межклеточное взаимодействие во множестве различных БП. В результате исходного высвобождения ДНК множество бактерий получают специфические программы ДНК-синтеза. Связь между синтезом внеклеточной ДНК и способностью к развитию био пленки описана у многих бактерий, включая *Streptococcus pneumoniae* [29], *Bacillus subtilis* [30], *Acinetobacter calcoaceticus* [31], *Neisseria gonorrhoeae* [32], *Pseudomonas stutzeri* [33].

Существуют доказательства участия внеклеточной ДНК в качестве межклеточного посредника, как для эталонного изолята *P. aeruginosa* PAO1, так и для клинических изолятов. Образование био пленки *P. aeruginosa* PAO1 в лунках иммунологического планшета было ослаблено в присутствии ДНКазы I типа, а в системах с током жидкости образование био пленки практически отсутствовало при добавлении бульона с ДНКазой I типа. Так же было обнаружено, что незрелая био пленка быстро разрушается при обработке раствором ДНКазы I типа, в то время как сформировавшаяся био пленка остаётся стабильной. Данный факт указывает на то, что в зрелом состоянии БП стабилизируют другие компоненты, отличные от ДНК. Matsukawa и Greenberg исследовали состав зрелой био пленки PAO1 и обнаружили, что ДНК является наиболее распространённым полимером, однако наиболее важным оказался полисахарид, кодируемый генами *psl*. Есть данные о том, что зрелые био пленки некоторых изолятов поддаются разрушению под воздействием

ДНКазы. Так же представлены доказательства того, что внеклеточная ДНК может иметь ведущее значение в распространении биоплёнки [67].

Выявлен ряд генов, ответственных за формирование БП. Генетические элементы, кодирующие биосинтез полисахаридов матрикса PEL, объединены в генный кластер, состоящий из семи открытых для считывания участков, названных *pelA-G* (*pellicle formation*; PA3058-PA3064). Точная функция продуктов экспрессии генов до конца не определена. Однако изучение последовательности показало, что в этих белках есть домены, которые вовлечены в синтез полисахаридов у других организмов. Добавочный регуляторный ген (*agr*) системы сигнальных молекул *S.aureus* и других стафилококков играет ведущую роль в регуляции факторов вирулентности в патогенезе биопленкоассоциированной стафилококковой инфекции.

### 3. ИНФЕКЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

Инфекция (инфекционный процесс) – патологический процесс, возникающий в результате взаимодействия микроорганизмов с макроорганизмом, сопровождающийся подавлением иммунитета, размножением микроорганизмов, повреждением тканей, нарушением функции органов и систем макроорганизма с последующим развитием защитно-приспособительных реакций.

Инфекционный процесс возникает при соблюдении трех необходимых условий: патогенный возбудитель, способность его проникать в организм, восприимчивость макроорганизма. От взаимодействия трех этих условий зависит активность и интенсивность инфекционного процесса. От патогенности возбудителя (его дозы и вирулентности), наличия естественных барьеров макроорганизма, места проникновения возбудителя через барьеры, влияния внутренних и внешних факторов зависит интенсивность инфекционного процесса. Инфекционная болезнь – это крайнее проявление инфекционного процесса.

Входные ворота инфекции – место проникновения микроорганизма в макроорганизм.

Облигатно-патогенные микроорганизмы (например, возбудители холеры, чумы, сибирской язвы и др.) обладают, как правило, высокой вирулентностью, факторами подавления и преодоления естественных барьеров иммунитета. Даже при попадании в организм человека незначительных доз инфекционных агентов у большинства не иммунных лиц возникает заболевание. В этом случае для защиты от возбудителя требуется предварительная активация системы иммунитета.

Условно-патогенные микроорганизмы могут вызывать инфекционный процесс в макроорганизме с нормальной иммунной системой только в случае большой инфицирующей дозы на единицу защитного фактора. Поэтому инфекции, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами, возникают обычно у людей с иммунодефицитами, или на фоне другого неинфекционного заболевания, которое сопровождается нарушением целостности кожных покровов и слизистых, изменением функции органов и систем [47, 68].

Инфекционные болезни – это обширная группа заболеваний человека, вызываемых патогенными бактериями, вирусами и простейшими. Обычно любой процесс характеризуется последовательной сменой разных периодов: инкубационный, продромальный, клинический (разгара болезни) и реконвалесценции [69].

Инкубационный период: начало – проникновение возбудителя в макроорганизм и конец – появление первых признаков инфекции (как правило, составляет от нескольких часов до нескольких месяцев). Продромальный период – появляются первые симптомы инфекционного

заболевания. Период развития основных клинических симптомов, характеризуется основными признаками: лихорадкой, нарушением функции центральной и вегетативной нервной системы, органов дыхания, пищеварения, характерными изменениями в крови и др. Период реконвалесценции, характеризуется постепенным восстановлением функций макроорганизма.

Возможные исходы инфекционной болезни: реконвалесценция (выздоровление), летальный исход, бактерионосительство.

Разнообразие зависит от условий инфицирования, биологических свойств возбудителя, его локализации в организме, особенностей макроорганизма и других факторов. Среди форм инфекционного процесса по происхождению различают экзогенную инфекцию (возникает при заражении микроорганизмами извне) и эндогенную инфекцию (вызывают микробы, находящиеся в самом макроорганизме).

В зависимости от локализации возбудителя заболевания различают местную (очаговую, локальную) инфекцию (возбудитель остается только в местном очаге) и генерализованную инфекцию (микроорганизмы распространяются по всему макроорганизму). При снижении резистентности макроорганизма местный процесс может принять характер генерализованного.

По распространенности возбудителя в макроорганизме можно выделить следующие формы: бактериемию (микроорганизм находится в крови без признаков размножения), токсинемию (возбудитель остается в местном очаге, а в кровь поступают токсины), септицемию (кровь является местом обитания и размножения микроорганизмов) и септикопиемию (при возникновении во внутренних органах гнойных очагов).

Различают также моноинфекцию (вызвана одним видом микроорганизмов), смешанную, или микст (инфекция, вызванная одновременно несколькими видами микробов), вторичную (к инфекционному процессу присоединяется новый возбудитель, например, на фоне гриппа развивается бактериальная пневмония), суперинфекцию (заражение более патогенным микробом), реинфекцию (повторное заражение одним и тем же возбудителем, после полного клинического и бактериологического выздоровления), рецидив (появление признаков того же заболевания, обусловленное возбудителем, оставшимся в организме, после клинического выздоровления, без бактериологического).

Бактерионосительство может быть длительным, транзиторным (кратковременное выделение возбудителя при отсутствии клинических проявлений), острым (выделение возбудителя после перенесенного заболевания от нескольких дней до трех месяцев) и хроническим (выделение возбудителя обычно у лиц с иммунодефицитами в течение от нескольких месяцев до нескольких лет).

Среди форм инфекционного заболевания выделяют: типичную, атипичную, субклиническую, латентную, abortивную. Типичной форме присущи характерные признаки данного заболевания, атипичное заболевание протекает необычным образом. Субклиническая инфекция характеризуется отсутствием клинических проявлений, однако в результате ее обычно формируется полноценный иммунитет, и организм освобождается от возбудителя. Латентная инфекция протекает скрыто, возбудитель находится в особой стадии своего существования (например, L-форма или провирус) и не поступает в окружающую среду. Под влиянием некоторых факторов латентная инфекция может трансформироваться в острую, в результате возбудитель приобретает свои обычные свойства (герпетическая инфекция, бруцеллез, туберкулез, токсоплазмоз). Abortивная форма заболевания характеризуется тем, что болезнь после типичного начала быстро прекращается. Это связано или с развивающимся иммунным ответом, или же является результатом проводимой антимикробной терапии.

По тяжести течения выделяют легкую, среднюю и тяжелую степень тяжести инфекционного заболевания.

В случае способности возбудителя формировать биопленку инфекционный процесс на начальных стадиях протекает по описанным выше закономерностям. Однако далее, после образования БП, может иметь тенденцию к утяжелению, рецидивированию и хронизации [70].

### **3.1 Патогенность и вирулентность**

Все микроорганизмы различаются по своей способности вызывать инфекционный процесс у человека или животных, т.е. по патогенности. Патогенность, или болезнетворность, является видовым признаком и представляет собой потенциальную возможность микроорганизма вызывать заболевание в чувствительном к нему макроорганизме. Патогенность создает специфику инфекционного процесса, закреплена генетически и определяется способностью микроорганизмов образовывать токсины, ферменты агрессии, наличием рецепторов к клеткам-мишеням [41, 47].

Вирулентность – степень патогенности, является индивидуальным фенотипическим признаком каждого отдельного изолята патогенного микроорганизма. Это – мера патогенности, ее количественная характеристика.

В вирусологии вместо термина «вирулентность» применяют термин «инфекционность» или «инфекциозность».

В лабораторных условиях о вирулентности микробов и силе действия их токсинов судят по величине летальной (LD) и инфицирующей (ID) доз.

Летальная доза – это наименьшая доза живого возбудителя или токсина, вызывающая за указанный срок гибель определенного количества животных (в процентах), взятых в опыт.

Инфицирующая доза – это минимальная доза живых микробов, способная вызвать инфекционное заболевание у определенного количества животных (в процентах), взятых в опыт.

Среди этих параметров различают: Dcl (*dosis certae letalis*) – наименьшее количество живого микроба или его токсина, вызывающее в течение указанного времени гибель 100% экспериментальных животных стандартного возраста и веса, взятых в опыт. Это абсолютно смертельная доза.

Dlm (*dosis letalis minima*) – наименьшее количество живого микроба или его токсина, вызывающее в течение указанного времени гибель 95% экспериментальных животных, взятых в опыт.

ID100 – это наименьшее количество живых микробов, вызывающее развитие инфекционного заболевания у 100% зараженных экспериментальных животных стандартного возраста и веса, взятых в опыт.

Наиболее точными показателями являются 50% летальная, или инфицирующая доза. LD50 – это доза живого микроба или его токсина, вызывающая в течение указанного времени гибель 50% экспериментальных животных, взятых в опыт; в свою очередь ID50 – это минимальное количество живых микробов, способное вызвать развитие инфекционного заболевания у 50% зараженных экспериментальных животных, взятых в опыт.

Изоляты любого вида микроба могут быть подразделены на высоко-, умеренно-, слабо- и авирулентные.

Высоковирулентные микроорганизмы даже в малых дозах могут вызывать заболевания со смертельным исходом у иммунологически здоровых индивидуумов, а условно-патогенные маловирулентные – лишь при иммунодефицитах и большой дозе инфекта. Вирулентность патогенных микроорганизмов связана со способностью избирательно прикрепляться к чувствительным клеткам хозяина (адгезия), размножаться на их поверхности (колонизация), проникать в эти клетки (пенетрация) или подлежащие ткани (инвазия), преодолевать неспецифические и специфические факторы иммунитета (агрессия), образовывать экзотоксины (токсигенность), иметь общие антигены с клетками макроорганизма (антигенная мимикрия), оказывать иммунодепрессивное действие [40, 71].

Первые этапы инфекционного процесса – адгезия и колонизация – обусловлены неспецифическими и специфическими факторами.

Адгезия микробов к эпителию необходима для их размножения и образования колоний. Первый этап адгезии микроорганизмов представляет

собой обратимый процесс, связанный с действием неспецифических физико-химических сил взаимодействия между молекулами и структурами на поверхностях микроорганизма и твёрдого субстрата. Вторым этапом микробной адгезии необратим: бактериальная клетка прочно связывается с субстратом посредством жгутиков, пилей, неполимерных адгезинов.

Многие бактерии имеют пили, которыми прилипают к поверхности клеток. Липотейхоевые кислоты и М-белки стрептококков (*Streptococcus pyogenes*) имеются на фимбриях и обуславливают их адгезию к эпителию слизистой оболочки полости рта. Специфичность взаимодействия микроорганизмов с рецепторами на поверхности клеток обуславливает тропность отдельных возбудителей к определенным органам и тканям. Она определяет основные пути проникновения (входные ворота) и механизм передачи инфекции. Так, ряд бактерий и вирусов имеет специфические адгезины к рецепторам эпителия дыхательных путей и могут распространяться только с помощью аэрогенного механизма передачи (респираторная группа инфекций).

После адгезии клетки теряют подвижность, прилипают друг к другу, начинают выделять поверхностные белки-адгезины и лектины фимбрий, которые ограничивают скопления бактериальных клеток, и способствуют прикреплению их к субстрату и межклеточным взаимодействиям. Далее бактерии более прочно прилипают к поверхности клеточного монослоя на субстрате, обмениваются генами, начинают синтезировать внеклеточное полимерное вещество, формируется БП [72]. После созревания биопленки от нее могут отделяться микроколонии с последующим формированием новой БП.

Из входных ворот возбудитель распространяется различными путями. В одних случаях он попадает в лимфатические сосуды и током лимфы разносится по органам и тканям (лимфогенный путь распространения). В других случаях возбудитель распространяется с током крови (гематогенный путь распространения). От места входных ворот зависит клиническая картина заболевания. Например, если чумный микроб проникает через кожу, развивается бубонная или кожно-бубонная форма, через дыхательные пути – легочная.

Многие возбудители инфекционных заболеваний размножаются внутриклеточно и способны распространяться в межклеточном пространстве различных органов, в связи с чем очень важными компонентами вирулентности являются пенетрация и инвазия, которые, как правило, связаны со способностью микроорганизмов продуцировать ферменты, вызывающие повреждение мембран живых клеток и волокон тканей: гиалуронидазу, нейраминидазу, протеиназы и др.

Инвазия в ткани для многих бактерий – ведущий механизм вирулентности. Некоторые виды сальмонелл проникают в стенку кишечника через контакты эпителиальных клеток.

Агрессия – собирательный фактор вирулентности, определяется способностью микроорганизмов подавлять неспецифическую и иммунную защиту организма с помощью специальных веществ различной природы, встроенных в поверхностные структуры стенки (белок А стафилококка, белок М гемолитического стрептококка, липополисахариды грамотрицательных бактерий, корд-фактор возбудителя туберкулеза, H-, O- и Vi-антигены энтеробактерий и др.), а также специальных ферментов или токсических метаболитов, которые разрушают и инактивируют иммуноглобулины, комплемент, лизоцим, интерфероны и другие гуморальные и клеточные компоненты иммунитета.

Уклонение от переваривания фагоцитами – распространенный механизм. Одни бактерии, подобно шигеллам в клетках, «скрываются» от макрофагов в клетках, которые их не переваривают. Другие «обходят» механизмы переваривания в самих макрофагах. Так, *Legionella pneumophila* проникает в альвеолярные макрофаги и индуцирует пневмонии. Прилипание их к макрофагам вызывает появление длинных псевдоподий, которые образуют вокруг легионеллы кольца, формирующие затем пузырьки (кольцевой или спиральный фагоцитоз). Фаголизосомы ингибируются и бактерии размножаются в пузырьках.

В 2016 году впервые в Республике Беларусь был зарегистрирован случай внебольничной пневмонии, вызванной инфицированием пациентки *Legionella pneumophila* серогруппы 1 и показан источник инфицирования в квартирном очаге – система горячего водоснабжения [73]. Данный возбудитель обладает высокой способностью формировать биопленку [74]. Микобактерии туберкулеза и бруцеллы живут в цитоплазме вне фагосом, а другие бактерии могут быть резистентны к ферментам фаголизосом. Существуют и иные антифагоцитарные механизмы, в частности, связывание белков хозяина. Стафилококк имеет белок А, который взаимодействует с Fc-фрагментом IgG. Фагоцит может не распознавать такой стафилококк, покрытый IgG [40, 71].

В качестве факторов патогенности и вирулентности выступают сигнальные молекулы (Quorum sensing - QS), полисахариды экстрацеллюлярного матрикса, а также поверхностные белки БП. Формирование биопленки приводит к повышению вирулентности бактерий [70]. ПЦР анализ показал значительное увеличение экспрессии генов вирулентных пептидов у *S. mutans* и *S. sanguinis* по сравнению с планктонными формами. Так же наблюдалась экспрессия генов вирулентных пептидов *S. pneumoniae*, не характерных для планктонных форм.



### 3.1.1 Сигнальные молекулы

Одним из видов межклеточной сигнализации является Quorum sensing – форма бактериального межклеточного взаимодействия при котором бактерии секретируют и воспринимают сигнальные молекулы, известные как аутоиндукторы. Понятие «ощущение кворума» (quorum sensing) было предложено в 1994 году. Обнаружено несколько циклов QS, при этом некоторые из бактерий используют сразу несколько циклов QS для мониторинга окружающей среды [75]. Бактерии используют несколько классов молекул для межклеточной коммуникации. Некоторые грамположительные бактерии используют пептиды, в то время как для грамотрицательных бактерий характерно использование ацилгомосерин лактона (известного как AHL или AI-1) для межклеточных взаимодействий. Другие молекулы, такие как  $\gamma$ -бутиролактон, хинолоны и гидроксикетоны, также используются для внутривидового взаимодействия у *Streptomyces spp.*, *P.aeruginosa* и *V. cholerae*, соответственно. AI-2 (семейство преобразованных циклических лактолов) также используется для внутривидового взаимодействия. Не смотря на то, что фермент, участвующий в образовании AI-2, известный как LuxS, обнаружен у около 70 видов бактерий, только немногие из них обладают рецепторами для их обнаружения: LuxP рецептор у *V.harveyi* и LsrB у *E.coli/Salmonella* связываются с различными формами AI-2; LuxP связывается с фуранозил борированным диэфиром, тогда как LsrB связывается с (2R,4S)-2-метил-2,3,3,4-тетрагидрокситетрагидрофураном (R-THMF), в котором нет бора. Другой белок, связывающийся с модифицированным AI-2 – LsrR транскрипционный регулятор у *E.coli/Salmonella*, который присоединяется к фосфорилированному AI-2. Несмотря на недостаток идентификации AI-2 рецепторов у бактерий, на сегодняшний день установлена роль этой молекулы в межклеточных взаимодействиях и медиации факторов вирулентности, например, у *V.vulnificus*, *S.marcescens* и *C.perfringens*. У других бактерий LuxS (синтаза для AI-2) может играть дополнительную, ещё не изученную роль. Также возможно LuxS-независимое формирование AI-2 из рибулоза-5-фосфата. Значение альтернативного способа синтеза AI-2 в QS ещё следует полностью изучить [76].

Бактерии могут определять молекулы, синтезированные эукариотическими клетками макроорганизма и регулировать экспрессию генов в зависимости от молекул, продуцированных макроорганизмом. Например, энтерогеморрагический серотип *E.coli* (ЕНЕС) O157:H7, который ответственен за вспышки кровавой диареи и уремического синдрома, зависит от эукариотического гормона эпинефрина. Было показано снижение бактериального ответа на этот гормон при использовании  $\beta$ - $\alpha$ -адренергических антагонистов. ЕНЕС и некоторые другие бактерии также продуцируют аутоиндуктор, известный как AI-3, чьё строение до сих пор не изучено.

### 3.1.2 Сигнальные молекулы некоторых патогенов человека

Система QS *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *S. typhimurium* и *E. coli* является предметом изучения по причине многочисленных заболеваний, возникающих по вине этих бактерий. QS *P. aeruginosa* изучен наиболее тщательно. *P. aeruginosa* может вызывать различные инфекции респираторного, мочевого тракта, а так же и инфекцию хронических ран или бактериемию. Существует две основные системы QS синегнойной палочки: *las*- и *rhl*-системы [77]. Эти системы состоят из регуляторов транскрипции, которые взаимодействуют с аутоиндукторами, произведёнными LasI-и hII-синтазами. LasI продуцирует 3-охо-C12-HSL, который определяется Las рецептором (LasR), тогда как RhlI продуцирует C4-HSL, который определяется Rhl рецептором (RhlR). Las и rhl QS системы организованы в иерархической манере. LasR: 3-охо-C12-HSL комплекс регулирует экспрессию *rhl*-системы. Также, определено, что *las*-система посттрансляционно регулирует *rhl*-систему. Это достигается через конкурентоспособное прикрепление 3-охо-C12-HSL к RhlR при низкой концентрации C4-HSL. Транскрипционный регулятор QscR репрессирует транскрипцию *lasI* и *rhlI*. *P. aeruginosa* также производит третью QS сигнальную молекулу, известную как *Pseudomonas* хинолон-сигнал (2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон). Точечный анализ показал, что несколько сотен генов находятся под QS контролем у *P. aeruginosa*. Эти гены регулируют различные факторы патогенеза, такие как эластазу (*lasB*), LasA-протеазу (*lasA*), щелочную протеазу (*apr*). Четвёртый класс молекул, обнаруженных у *P. aeruginosa*, – дипептидный пиперазин. *P. aeruginosa* может использовать пиперазины для коммуникации с другими бактериями, такими как *P. mirabilis*, *C. freundii*, и *E. agglomerans* [78]. Дополнительные исследования покажут, является ли данный класс молекул QS сигнальным.

*S. aureus* – патоген, ответственный за возникновение большинства послеоперационных осложнений, а так же пневмоний, острого эндокардита и гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей. Добавочный регуляторный ген *agr* системы QS *S. aureus* и других стафилококков играет ведущую роль в регуляции факторов вирулентности в патогенезе стафилококковой инфекции. *Agr* локус состоит из P2 оперона (*agrACDB*) и P3 оперона, чей транскрипт кодирует  $\alpha$ -токсин (*hld*) в дополнение к регуляции экспрессии *agr*. В *agr* QS-системе аутоиндукторный пептид (AIP) синтезирован из AgrD протеина посредством AgrB-ассоциированного образования тиолактонового кольца между сохранённым центральным цистеином и С-конечной карбоксильной группой. Вероятно, что и другие протеины, кроме связанного с мембраной AgrB, могут быть вовлечены в метаболизм AgrD [79]. Секретированный AIP распознаётся мембран-связанным AgrC и вызывает передачу фосфатной группы между AgrC и AgrA. AgrA совместно с

другими протеинами, такими как регулятор транскрипции SarA, активируют транскрипцию оперонов P2 и P3. Система *agr* регулирует факторы вирулентности, такие как энтеротоксины В и С, протеазы (splA, B, D, F и V8). Интересно, что AIP, продуцированный одной из 4 различных Agr групп, ингибирует сигнальные молекулы другого стафилококка, который использует Agr-группу. Ингибирование происходит посредством конкурентного связывания с AgrC-рецептором. Например, AIP *S.epidermidis*, блокирует все Agr-группы *S.aureus*, кроме четвёртой. Также недавние исследования показали, что *agr* экспрессия *in vivo* более комплексная, чем это считалось ранее, и может зависеть от нескольких факторов окружающей среды [77].

### 3.1.3 Полисахариды экстрацеллюлярного матрикса биоплёнок

Химический состав и физические свойства полисахаридов матрикса могут значительно варьировать в зависимости от типа мономеров, способа их связи ( $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,3 или  $\alpha$ -1,6), а также наличия различных органических и неорганических субстанций. Наиболее важные полисахариды, которые играют ведущую роль в формировании биоплёнок большого числа видов бактерий: целлюлоза, PNAG/PIA, PEL, PSL и VPS.

Целлюлоза – наиболее широко распространённый полисахарид в природе, продуцируется как растениями, так и бактериями. Выработка бактериальной целлюлозы описана у большого количества бактерий, таких как *Gluconacteobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum*), *Sarcina ventriculi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*, *E. coli*, *Salmonella spp.* и *Pseudomonas fluorescense*. Исследования показывают, что возможностью образовывать целлюлозу обладают и другие бактерии: *Vibrio*, *Yersinia* и изоляты *Burkholderia* [80, 81].

У целлюлоза-синтезирующих бактерий генетическая информация, ответственная за синтез целлюлозы, находится в опероне, состоящем из четырех генов: *bcsA*, *bcsB*, *bcsC*, *bcsD* (*bacterial cellulose synthesis*). Полимеризация мономеров уридиндифосфат-глюкозы в целлюлозу катализируется целлюлозной синтазой BcsA. Несколько трансмембранных доменов удерживают целлюлозную синтазу BcsA в цитоплазматической мембране. Непосредственно возле BcsA можно обнаружить BcsB-протеин. Он регулирует активность целлюлозной синтазы посредством связывания вторичного медиатора c-di-GMP. Предполагается, что контролируемый переход c-di-GMP с BcsB на BcsA может активировать целлюлозную синтазу аллостерически. Недавние исследования показали наличие на C-конечном участке BcsA участка для связывания с c-di-GMP, названного PilZ-домен. Функциональное значение BcsC и BcsD до сих пор не описано. Некоторые авторы полагают, что BcsC может участвовать в формировании пор в клеточной стенке, а BcsD может влиять на процесс кристаллизации целлюлозы [82].

При исследовании *P. fluorescens* был обнаружен фенотип с высокой способностью к агрегации. Эта способность была связана с продукцией данным изолятом ацетилированной формы целлюлозы и белковых фимбрий, как факторов агрегации. Эксперименты показали, что целлюлозные волокна могут взаимодействовать с липополисахаридами (LPS) клеточной стенки бактерий, находящихся в непосредственной близости от *P. fluorescens*.

Роль поли-N-ацетилглюкозамина, как компонента матрикса биоплёнки, была изучена на грам(+) микроорганизмах: *S. epidermidis*, который синтезирует полисахаридный межклеточный адгезин (PIA), и *S. aureus*, который синтезирует поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG). Так же обнаружено, что PNAG/PIA подобные полисахариды синтезируются некоторыми грам(-) бактериями, такими как *E. coli*, *Y. pestis* и *Actinobacillus spp.* Сравнительный анализ геномов показал наличие генов, гомологичных ответственным за синтез поли-N-ацетилглюкозамина, у многих других бактерий, таких как *P. fluorescens*, *Bordetella pertussis*, *Ralstonia solanacearum*, *Lactococcus lactis*. Формирование БП стафилококками является мультифакторным процессом. Множество внеклеточных или прикрепленных к поверхности клетки полимеров принимают участие в прикреплении клетки к биотической или абиотической поверхности. Однако PNAG/PIA является наиболее важным компонентом матрикса биоплёнки стафилококков [83, 84].

Полисахариды PIA и PNAG, синтезируемые *S. epidermidis* и *S. aureus* соответственно, тесно связаны между собой химически и иммунологически. Оба они являются гомополисахаридами, состоящими из неразветвленных длинных полимерных цепочек D-глюкозамина, равномерно соединённых между собой через  $\alpha$ -1,6-глюкозидные связи. Однако они отличаются длиной цепи и модификацией [85].

Генетические элементы, кодирующие биосинтез поли-N-ацетилглюкозамина [86], находятся в опероне, состоящем из четырех генов: *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* (*intercellular adhesin*). IcaA, IcaC и IcaD находятся в клеточной мембране, в то время как IcaB обнаруживается внеклеточно. Полимеризация мономеров уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамина в полимерные цепи  $\beta$ -1,6-N-ацетилглюкозамина катализируется N-ацетилглюкозамин-трансферазой IcaA. Одновременная экспрессия *icaA* и *icaD* значительно увеличивает ферментативную активность, что указывает на поддерживающую функцию IcaD по отношению к IcaA. Олигомеры N-ацетилглюкозамина, продуцируемые только посредством IcaAD, достигают максимальной длины в 20 остатков. Для создания более длинных цепей необходимо созэкспрессия *icaAD* с *icaC*. SarA (*staphylococcal accessory regulator A*), глобальный регулятор экспрессии факторов вирулентности *S. aureus*, влияет на транскрипцию *icaADBC*, как у *S. aureus*, так и *S. epidermidis*. Обнаружено, что клетки стафилококков,

лишённые SarA, в меньшей степени прикрепляются к абиотическим поверхностям, таким как полистирол или стекло, как в статических системах, так и в системах с непрерывным движением жидкости [87].

*P.aeruginosa* в зависимости от изолята и условий роста может продуцировать по крайней мере три различных полисахарида: альгинат, PEL и PSL. Кроме этого, в геноме эталонного изолята *P.aeruginosa* PAO1 были обнаружены два дополнительных генных кластера, вовлечённых в биосинтез полисахаридов (PA1381-PA1398 и PA3552-PA3558). Мукоидные формы *P.aeruginosa*, которые экспрессируют *alg* гены (*alginate biosynthesis*, PA3540-PA3551), обнаруживаются преимущественно у пациентов, поражённых муковисцидозом лёгких [88].

Мукоидный фенотип бактерий возникает из-за перепроизводства альгината, фактора вирулентности, который даёт ряд преимуществ *P.aeruginosa*. Альгинат – высокомолекулярный, ацетилированный полимер, состоящий из неповторяющихся мономеров  $\beta$ -1,4-соединённых L-гулуруновой и D-маннуруновой кислот. Альгинат-продуцирующие изоляты *in vivo* появляются всё чаще из-за мутации негативного регулятора *tucA*. Существует четкая корреляция между появлением мукоидного фенотипа *P. aeruginosa* и ухудшением прогноза для пациента, поражённого муковисцидозом. Инфекция вызывает миграцию клеток воспаления в очаг инфекции (макрофагов, лейкоцитов, лимфоцитов), высвобождаются радикалы кислорода, что ведёт к повреждению тканей. Как оказалось, альгинат защищает *P.aeruginosa* от последствий воспаления: он связывает свободные радикалы, освобождённые активированными макрофагами *in vitro*, и защищает бактерии от фагоцитоза. Результаты нескольких независимых лабораторий показали, что гиперпродукция ацетилированного альгината ведёт к значительным архитектурным и морфологическим изменениям в БП. Это проявляется в увеличении резистентности к антимикробным препаратам. В исследованиях выявлено, что биоплёнка образуется как при наличии альгината, так и у изолятов, лишённых альгината. Увеличенная его продукция, связанная с мутацией *tucA*, ведёт к увеличению резистентности бактерий в составе БП к антибактериальным препаратам. Соответственно, у немуконидных изолятов альгинат не является основным компонентом внеклеточного матрикса [89].

PEL и PSL являются разветвлёнными гетерополисахаридами, однако основным компонентом PEL является глюкоза, в то время как PSL состоит в основном из маннозы. Высокий уровень экспрессии PEL и PSL у *P.aeruginosa* ведёт к формированию колоний R-типа на агаре. Синтез PEL позволяет *P.aeruginosa* формировать БП на поверхности жидкой питательной среды. Исследования показали, что PSL необходим на ранних стадиях формирования биоплёнки *P.aeruginosa*, в то время как PEL играет важную роль на поздних стадиях. В исследованиях БП в системах с током жидкости изоляты, испытывающие дефицит в образовании PSL,

замедленно формировали биоплёнку, что указывает на роль PSL именно на ранних стадиях формирования БП. Генетические элементы, кодирующие биосинтез PEL, объединены в генный кластер, состоящий из семи открытых для считывания участков, названных *pelA-G* (*pellicle formation*; PA3058-PA3064). Точная функция продуктов экспрессии генов до конца не определена. Однако изучение последовательности показало, что в этих белках есть домены, которые вовлечены в синтез полисахаридов у других организмов. Например, PelF гомологичен IV группе гликозил-трансферазы, PelE содержит домены, похожие на таковые у синтазы сукрозы. К тому же, полагают, что PelG является белком семейства PST, которое вовлечено в перемещение гликолипидных прекурсоров через мембрану [90].

Генный кластер *psl* (*polysaccharide synthesis locus*) состоит из 15 участков *pslA-O* (PA2231-PA2245). Анализ последовательностей первых 11 белков показал, что они вовлечены в биосинтез полисахаридов. PslF, PslH и PslI имеют гомологичные участки с I группой семейства гликозил-трансфераз. Так как PslA, PslJ и PslK содержат 6, 11 и 12 трансмембранных доменов, соответственно, то они, вероятнее всего, локализуются в клеточной мембране [91].

#### 3.1.4 Поверхностные белки как фактор патогенности и вирулентности

Генетические и микроскопические методы исследования подтверждают информацию о наличии протеинов, которые выступают в качестве межклеточных коннекторов во время формирования биопленки различными изолятами бактерий.

Объёмные клеточные выросты – флагеллы, фимбрии, пили – обычно состоят из множества ведущих структурных компонентов и нескольких вспомогательных белков. Движение, обусловленное флагеллами, может обеспечить инициацию формирования БП за счет перемещения бактерии, флагеллы могут выступать в роли адгезина клетка-клетка и клетка-поверхность [92]. Также они могут играть роль в более поздней стадии структурного развития биопленки [93].

Пили IV типа используются многими бактериями для обеспечения поверхность-ассоциированной подвижности. Кроме того пили IV типа участвуют в адгезии как к абиотическим, так и биотическим поверхностям [94]. Исследования *in vitro* выявили, что пили IV типа *P. aeruginosa* специфичны к *asialo-GM1* и *asialo-GM2* на поверхности клетки-хозяина [95]. Показано, что пили IV типа *N. gonorrhoeae* и *P. aeruginosa* высокоафинны к ДНК, и, т.к. экстрацеллюлярная ДНК является частью внеклеточного матрикса биопленки *P. aeruginosa* [96], пили IV типа могут участвовать в качестве связки между клеткой и экстрацеллюлярным матриксом. Sauer и Camper (2001) представили доказательства того, что

экспрессия главных структурных компонентов пилей IV типа (PilA) осуществляет подавление начальной стадии формирования БП и активизацию последних стадий развития биопленки [97].

Тип I фимброподобных органелл кодирован у многих энтеробактерий, они играют важную роль в жизнедеятельности этих организмов. Некоторые бактериальные клетки имеют 100-500 фимбрий I типа на своей поверхности. Фимбрии I типа содержат в основном структурный протеин FimA, при этом ряд дополнительных белков необходим для транспортировки и компоновки структурных протеинов. Компонент фимбрии I типа – манноза-специфический адгезин FimH – ответственен за связывание фимбрий I типа с эукариотической клеткой. Представлены доказательства, что фимбрии I типа играют роль в формировании биопленки *E. coli* на поверхности жидкой питательной среды. Фимбрии I типа ассоциированы с повышением образования биопленки *E.coli* в системах с током жидкости. Есть свидетельства, что фимбрии I типа, кроме того, что участвуют в прикреплении к поверхности эукариотических клеток, могут также выступать в роли компонента матрикса БП [98].

Наличие конъюгирующих пилей может обеспечить формирование биопленки *E. coli*. Было показано, что в системах с током жидкости конъюгирующие пили являются основным компонентом матрикса *E. coli*, в то время как другие известные факторы образования БП, такие как Ag43 и фимбрии I типа, малозначимы. Даже незначительные изменения структуры конъюгирующих пилей, например, вызванные делецией гена *traX*, ведут к образованию биопленки с повреждением ее пространственной структуры, либо угнетают формирование БП в целом [99].

*Curly*-жгутики были впервые обнаружены у *E.coli*, но дальнейшие исследования показали, что они также присутствуют у изолятов *Salmonella*, *Citrobacter* и *Enterobacter spp.* [100]. *Curly*-жгутики – тонкие амилоидоподобные структуры, выступающие на поверхности клетки в виде спутанного аморфного матрикса, они могут функционировать как адгезины клетка-клетка и клетка-поверхность [27]. Протеин CsgA – ведущий структурный компонент *curly*-жгутиков, а протеин CsgB – важная малая структурная единица. Полимеризация *curly*-жгутиков происходит на поверхности клетки в процессе так называемой внеклеточной «нуклеации». Эта «нуклеация» зависит от протеина CsgB. Исследование мутаций показало, что смешивание мутантов Csga и Csgb может привести к осаждению субъединиц *curly*-жгутиков на поверхности мутанта Csga. В дополнение к связыванию с поверхностью АБ и стимулированию формирования биопленки путем увеличения адгезии клетка-клетка, *curly*-жгутики демонстрируют взаимодействие с экзополимером клетки-хозяина, таким как фибронектин. Приведены доказательства того, что *curly*-

жгутики вместе с целлюлозой играют роль в формировании БП энтеробактериями, такими как *E. coli*, *Enterobacter spp.* и *Citrobacter spp.* У *E. coli* и *S. enterica* было показано, что координация экспрессии *curly*-жгутиков и целлюлозы регулируется через транскрипцию регулятора CsgD и домена GGDEF протеина AdrA [101].

У *E. coli* обнаружена группа поверхностных белков (Ag43, AIDA и TibA), названных самораспознающими аутоотранспортерами (*self associating autotransporters*, SAAT). Эти белки имеют ряд сходств и общих черт, таких как стимулирование клеточной агрегации и формирования биопленки. Межклеточное взаимодействие, которому способствуют эти белки, возможно в силу их способности к взаимодействию [102].

Белок TasA *Bacillus subtilis* был выявлен в качестве главного компонента внеклеточного матрикса, окружающего бактерии в период образования БП на поверхности жидкой питательной среды [103]. Базируясь на генетических и биохимических фактах, доказано, что для образования биопленки кроме белка TasA требуется экзополисахарид, кодируемый опероном *epsA-O*. Отсутствие обоих этих компонентов приводит к нарушению образования биопленки *B. subtilis*. Выявлено, что гены *eps* и *tasA* регулируются SinR *B. subtilis* [104]. Точная функция TasA во внеклеточном матриксе *B. subtilis* остается неизвестной, в то же время обнаружена его роль в сборке и созревании оболочки спор [21].

Лектины характеризуются сродством к карбогидрату, находящемуся на поверхности клетки-хозяина. Представлены доказательства того, что некоторые лектины узнают карбогидраты в экстрацеллюлярном матриксе БП и тем самым обеспечивают взаимодействие между клетками. Фукоза-специфичный лектин LecB *P. aeruginosa* необходим для развития биопленки, растущей при наличии тока жидкости [105]. Экспериментальное разделение клеток показало, что LecB экспортируется и связывается с наружной мембраной путем взаимодействия с лигандами, содержащими фукозу. Окрашивание БП *P. aeruginosa* с флуоресцентно помеченным протеином LecB подтвердило наличие лектин-связывающих участков в их структуре [106].

Поиски факторов, влияющих на формирование БП, выявили широко распространенную группу поверхностных белков с высокой молекулярной массой, которые характеризуются большим количеством повторяющихся структур. Семейство протеинов включает биопленка-ассоциированный протеин Var *S. aureus*, адгезионный протеин LapA *P. fluorescens* и *P. putida*, биопленка-ассоциированный протеин VarA *S. enterica*, поверхностный белок энтерококков Esp *E. faecalis*, адгезин AdhA *Burkholderia cenocepacia*. В дополнение к этому большая группа подобных белков обнаружена в геномных базах бактерий окружающей среды и бактерий, значимых для медицины [107]. Белок Var был впервые описан у *Staphylococcus aureus* [25]. Var демонстрировал стимулирование первичного прикрепления к



абиотическим поверхностям и межклеточной адгезии. Были представлены сведения о том, что делеция гена *bar* привела к снижению накопления главного экзополисахарида стафилококка – PIA.

У грам(+) бактерий описана большая группа белков, получивших название MSCRAMM-протеины (микробные поверхностные компоненты, которые распознают адгезивные молекулы матрикса). Большая группа MSCRAMM-протеинов имеет общие свойства с семейством белков Вар-типа, но функционально описываются в связи с адгезией к структурным элементам организма-хозяина, таким как фибронектин, фибриноген, коллаген, гепарин-связанные полисахариды, однако это не исключает их функцию в матриксе биопленки [26].

### 3.2 Иммуитет и инфекция

При взаимодействии микроорганизмов с макроорганизмом возможны следующие варианты: колонизация биотопов человека, освобождение макроорганизма от микробов без последствий. Факторы, которые определяют форму и тяжесть течения инфекционного процесса, зависят от микроорганизмов (доза, патогенность, вирулентность, способность формировать биопленку и т.д.) и от состояния макроорганизма (возраст, общее состояние здоровья, состояние иммунокомпетентных систем и т.д.).

Способность макроорганизма противостоять различным микроорганизмам обусловлена двумя механизмами: развитием специфического иммунитета к различным микробам и неспецифической противоинойфекционной резистентностью.

Неспецифическая резистентность макроорганизма к возбудителям инфекционных заболеваний связана с наличием барьера в виде кожных покровов и слизистых оболочек, которые без повреждения непреодолимы для многих возбудителей. Кожа также выделяет молочную и жирную кислоту, ферменты, пот, сальный секрет, которые обладают бактерицидными свойствами. Секреты, выделяемые слизистыми оболочками конъюнктивы глаза, носоглотки, ЖКТ, дыхательного и мочевого тракта удаляют микроорганизмы с поверхности, а также за счет pH-среды и бактериоцинов нормальной микрофлоры оказывают выраженное микробоцидное действие. В защите от бактерий значительную роль играет неиммунный фагоцитоз. Нормальное функционирование иммунной системы возможно только при сбалансированном питании, особенно обеспеченном витаминами. Физические и психические травмы, хронический алкоголизм, переутомление, переохлаждение и т.п., наоборот, оказывают выраженное негативное влияние на функционирование неспецифической противоинойфекционной резистентности.

Факторы, обеспечивающие неспецифическую резистентность макроорганизма, и контролируемые генами, обеспечивают видовой иммунитет – невосприимчивость организмов одного вида к инфекционным заболеваниям другого вида, вследствие исключения возможности размножения возбудителей. Существуют многочисленные данные о генетически наследуемой невосприимчивости отдельных популяций и индивидуумов к инфекционным заболеваниям (корь, туберкулез, малярия, чума, полиомиелит и др.).

Специфический иммунитет является наиболее важным фактором в защите макроорганизма от возбудителей инфекционных заболеваний и определяет варианты течения инфекционного процесса. Специфический иммунный ответ развивается в организме человека против антигенов микроорганизмов, продуктов жизнедеятельности и токсинов. В результате иммунные клетки макроорганизма (макрофаги) приобретают способность распознавать чужеродные антигены в месте их первичного внедрения. После взаимодействия макрофага и возбудителя запускается процесс формирования специфически реагирующих клонов эффекторных Т- и В-лимфоцитов. В зависимости от ряда факторов: строения антигенов возбудителя, его локализации, механизм санации организма человека может происходить с преобладанием гуморального В-клеточного или Т-клеточного иммунитета. После освобождения от микроорганизмов клоны эффекторных Т-клеток и секретирующих иммуноглобулины В-клеток могут сохраняться на длительный период времени, обеспечивая при отдельных инфекциях даже пожизненный иммунитет.

Феномен развития иммунологической памяти лежит в основе использования вакцин и анатоксинов. Основу коллективного иммунитета составляет специфический иммунитет у части компактно проживающих людей. Принято считать, что при наличии в коллективе более 80% индивидуумов, имеющих иммунитет, достаточно для прекращения эпидемического процесса даже высоко контагиозных инфекционных заболеваний. В то же время после вакцинирования не у всех людей развивается достаточный иммунитет, необходимый для прекращения эпидемического процесса. Поэтому при многих инфекциях необходимо прививать не менее 95% коллектива [69, 71].

Давно известно, что состояние иммунной системы зависит от возрастных параметров. При старении организма напряженность противоинфекционного иммунитета снижается, а организм новорожденных, несмотря на функционирование всех механизмов иммунной системы, не способен к полноценному иммунному ответу. В первые месяцы жизни наибольший вклад в защиту новорожденных от инфекционных агентов обеспечивают трансплацентарные иммуноглобулины IgG, а в дальнейшем более важную роль играют секреторные IgA, лизоцим, полученные с молоком матери.

### 3.2.1 Особенности антибактериального иммунитета

При многих бактериальных инфекциях микроорганизмы продуцируют экзотоксины (возбудители клостридиальных анаэробных инфекций, дифтерия, столбняк, ботулизм и др.), которые и определяют течение инфекционного процесса. Антитоксический иммунитет в этом случае обеспечивает защиту от возбудителей данных заболеваний. Антитоксические антитела связывают токсин и блокируют его возможности связываться с рецепторами. При бактериальных инфекциях, где синтез токсинов не является ведущим, наибольшее значение приобретает фагоцитоз, активность которого повышается при связывании микроорганизмов с антителами против них. Фагоциты способны связываться с Fc-фрагментами антител, которые своими Fab-фрагментами связаны с эпитопами антигенов на поверхности бактерий. Иммунный фагоцитоз сопровождается окислительным взрывом и активацией других бактерицидных систем фагоцитирующих клеток. Роль системы комплемента состоит в разрушении комплексов антитела-антиген на поверхности бактерии с последующим освобождением анафилотоксинов, которые усиливают приток гуморальных компонентов иммунитета и хемотаксис полиморфноядерных лейкоцитов. В случае, когда микроорганизмы паразитируют на поверхности слизистых оболочек биотопов человека и недоступны для фагоцитоза, главную роль в защите играет секреторный IgA [71].

Если инфекционный процесс вызвали бактерии, паразитирующие внутриклеточно (бруцеллы, микобактерии, риккетсии, хламидии и микоплазмы), то механизм защиты обеспечивается продукцией специфических лимфокин-продуцирующих Т-хелперов 2-го типа. Последние при контакте с зараженными макрофагами выделяют  $\gamma$ -интерферон, который активирует естественные и Т-киллеры. Определить выраженность иммунитета в этом случае могут помочь кожно-аллергические пробы и оценка *in vitro* в тестах (РБТЛ, РТМЛ и др.).

Для серологической диагностики бактериальных инфекций часто используется определение титра циркулирующих антител в динамике инфекционного процесса. Также используется определение IgM, которые образуются раньше, чем IgG, и только при первом контакте иммунной системы с возбудителем. При многих инфекционных заболеваниях, вызванных условно-патогенными бактериями, за счет наличия среди них большого числа сероваров, антибактериальный иммунитет, как правило, является типоспецифическим и нестойким. В результате возможны частые повторные случаи заболевания и возникает необходимость периодического использования профилактических вакцин без достаточно хорошего эффекта.

### 3.2.2 Особенности иммунитета на микроорганизмы, образующие биопленку

Новым направлением является изучение иммунного ответа макроорганизма на инфекции, ассоциированные с БП. В современной специальной литературе встречается информация о снижении эффективности неспецифических механизмов защиты организма на микроорганизмы в составе биопленок [108]. Было показано, что бактерии в составе биопленки *Mycoplasma pulmonis* не восприимчивы к действию системы комплемента [109], в то время как биопленка *S.epidermidis* устойчива к фагоцитозу нейтрофилами [110].

На сегодняшний день обнаружены иммуноглобулины с ферментными свойствами – абзимы (от английской аббревиатуры *antibody-enzyme*), или каталитически активные антитела, которые, в том числе, обладают способностью разрушать матрикс биоплёнок [111]. Абзимы – это каталитически активные антитела. В широком смысле термином «абзимы» обычно называют моноклональные каталитически активные антитела, обладающие свойствами ферментов – то есть катализирующие определенные химические реакции [112].

### 3.3 Критерии этиологической роли условно-патогенных микробов

В настоящее время при определении этиологической роли условно-патогенных микроорганизмов при гнойно-воспалительных заболеваниях и осложнениях пользуются рядом критериев. Данные критерии условны и, как правило, мало надежны (изложены в порядке своей значимости и условно объединены в группы).

Клинико-лабораторные:

1. Основной – выделение возбудителя из исследуемого материала. При выделении культуры из стерильных в норме биологических жидкостей организма: внутрисуставной жидкости, крови, спинномозговой жидкости данный критерий приобретает практически решающее значение. Если микроорганизм выделен из других нестерильных источников, большее значение приобретают другие критерии. При отрицательном ответе также нельзя судить о стерильности исследуемой пробы, т.к. возможны причины методического характера (недостаточное оснащение лаборатории) и возможно присутствие в клиническом материале антибиотиков, антисептиков и др. В таком случае необходимо ориентироваться на данные клинических и др. лабораторных исследований.

2. Второй по важности критерий – численность микроорганизмов в исследуемом материале, или так называемое «критическое число» (рассчитывают на 1 мл или 1 г). Принято считать для бактерий

«критическое число»  $> 10^5$  в 1 мл, в некоторых случаях  $\geq 10^4$ ; для грибов, анаэробов и простейших оно  $\geq 10^3$ - $10^4$ . Этот критерий считается решающим в диагностике условно-патогенных микроорганизмов. На практике вопрос намного сложнее и всегда следует учитывать все указанные критерии в комплексе; особое внимание обратить на то, как взят исследуемый материал (например, при взятии мочи катетером с соблюдением всех правил число ниже  $10^3$  тоже расценивают как значимое). В то же время при проведении антибактериальной терапии и использовании антисептиков ввиду снижения микробной популяции ориентироваться на критическое число не представляется целесообразным.

3. К следующему критерию прибегают в сомнительных случаях, например, при выделении микроорганизма в исследуемом материале ниже критического числа, при подозрении на микробную контаминацию исследуемого материала (пунктата, мочи, спинномозговой жидкости, крови). В этом случае повторное исследование материала от пациента проводят в течение суток. Выделение того же вида микроорганизмов (более точно – варианта) подтверждает вывод об этиологической роли данного возбудителя.

4. Обнаружение у выделенной культуры факторов патогенности (оценка критерия практически не разработана, сложность вызывает трактовка признаков патогенности, особенно количественных критериев, присущих большинству представителей данного вида). В том числе микроорганизмы, формирующие биопленки, этиологически более значимы.

Иммунологические:

1. Серологический критерий – рост в 4 и более раз в сыворотке крови пациента антител (к аутокультуре при заболеваниях, вызванных условно-патогенными микроорганизмами) в динамике заболевания (для более современных и чувствительных методов, например ИФА, достаточно достоверного нарастания титра антител по сравнению с контролем). Более значимым является определение класса иммуноглобулинов. Наличие в крови пациента антител класса М характерно только для первичного иммунного ответа и подтверждает этиологию инфекционного заболевания. Определение антител к компонентам биопленки.

2. Аллергический критерий – наличие сенсibilизации, выявляемой при постановке РБТЛ, кожно-аллергических проб и др.

Клинические:

1. Прямая корреляция между чувствительностью выделенной культуры микроорганизма от пациента к антибиотикам и антисептикам и эффективностью проводимой антимикробной терапии.

2. Наличие высокой положительной корреляции между клиническим улучшением при рациональной антибиотикотерапии и

уменьшением количества микроорганизмов при посеве.

3. Длительное течение заболевания, утяжеление и хронизация инфекционного процесса.

Эпидемиологические:

1. Принадлежность выделенной культуры к нозокомиальным изолятам или эковарам.

2. Установление идентичности выделенных культур (биоваров, сероваров, фаговаров) от группы пациентов при вспышке заболевания или пациентов и сотрудников одного лечебного учреждения.

Статистические:

Процент встречаемости возбудителя в качестве этиологического агента той или иной нозологической формы согласно литературным данным.

#### 4. АНТИМИКРОБНАЯ ТЕРАПИЯ

Все антимикробные средства можно разделить на следующие основные группы:

I. Химиопрепараты:

- антибиотики;
- антисептики.

II. Биологические препараты:

- бактериальные препараты – живые культуры микроорганизмов, как правило представители нормальной микрофлоры человека, способные выделять вещества с антимикробной активностью;
- бактериофаги – вирусы бактерий, которые используются с лечебной или профилактической целью, способны проникать через биопленку;
- иммунобиологические препараты – антитела против микроорганизмов и их токсинов (сыворотки и иммуноглобулины), препараты цитокинов (например, интерфероны, интерлейкины и др.), сыворотка и иммуноглобулины способны разрушать биопленку.

III. Физические факторы (температура, давление, излучение и др.).

Химиотерапия – лечение бактериальных, вирусных и паразитарных заболеваний с помощью химиотерапевтических препаратов, которые избирательно подавляют развитие и размножение соответствующих инфекционных агентов в организме человека.

Химиопрофилактика – назначение химиопрепаратов с профилактической целью. Более часто в клинике используются термины антибиотикотерапия и антибиотикопрофилактика.

Химиопрепараты должны действовать этиотропно, а не органотропно. Безвредность препаратов оценивают с помощью химиотерапевтического индекса (ХТИ – отношение минимальной терапевтической дозы к максимально переносимой дозе), который должен быть меньше единицы.

Различают бактериостатическое действие препарата – прекращение роста и размножения бактерий за счет нарушения биохимических процессов в клетке (тетрацилин, хлорамфеникол, макролиды); бактерицидное действие – гибель клетки (пенициллин, цефалоспорины, карбапенемы, аминогликозиды); бактериолитическое действие – лизис микроорганизма за счет гидролиза связей между ацетилмурамовой кислотой и ацетилглюкозамином в полисахаридных цепях пептидогликанового слоя клеточной стенки (например, лизоцим).

Антибиотики – химиотерапевтические вещества природного (микробного, грибкового, животного, растительного и т.д.), полусинтетического или синтетического происхождения, которые в малых количествах подавляют размножение и/или вызывают гибель микроорганизмов (опухолевых клеток) в организме человека и животных.

К антибиотикам предъявляют требования:

- наличие высокой избирательной активности (селективность антимикробного эффекта) в дозах нетоксичных для макроорганизма;
- отсутствие или небольшой процент побочных эффектов;
- сохранение антимикробной активности в жидкостях и тканях макроорганизма, низкий уровень инактивации ферментами макроорганизма и белками сыворотки крови;
- хорошее всасывание, распределение и выведение, обеспечивающие высокие концентрации препарата в макроорганизме, включая ликвор, в течение достаточно продолжительного отрезка времени;
- хорошее проникновение через биопленку;
- при инфекциях, вызванных грам(–) флорой, предупреждение развития эндотоксического шока;
- отсутствие или медленное развитие резистентности даже при длительном применении;
- длительный период полураспада (прием не более 1–2 раза в сутки);
- низкая стоимость на весь курс антибиотикотерапии при высокой эффективности препарата;
- лекарственная форма удобна для практического использования (выпуск в различных формах для ступенчатой антибиотикотерапии) в разных возрастных группах, при различной локализации процесса, стабильность при хранении.

На практике ни один из препаратов не отвечает всем требованиям [113, 114, 115].

#### **4.1 Рациональная антибактериальная терапия**

Рациональное применение антибактериальных препаратов в до- и послеоперационном периоде во многом предопределяет успех лечения гнойно-воспалительных заболеваний.

При разработке схем эмпирической антибиотикотерапии в порядке приоритетов необходимо учитывать следующее:

1. Данные микробиологического исследования, выполненные в динамике с периодичностью 5-10 суток в зависимости от нозологии.

2. Фармакокинетику и фармакодинамику:

– принимать во внимание, что антибактериальный препарат должен достигать места локализации инфекции в концентрациях, превышающих МПК, в том числе и при внутриклеточной локализации возбудителя, например в нейтрофилах. В связи с этим отдают предпочтение антибиотикам, которые легко проникают в ткани даже при нарушении микроциркуляции, которая наблюдается, например, при сахарном диабете. Доказано, что БП является действенным механизмом защиты от



большинства антибактериальных препаратов. Поэтому, несмотря на то, что по критериям назначения антибиотикотерапии большинство обследованных пациентов нуждаются в системной химиотерапии, её эффективность сомнительна в отношении бактерий в составе биопленки;

- подбирать оптимальную дозировку и интервал между введением препарата;
- при длительной терапии, по возможности, минимизировать побочные эффекты (выбирать препараты с минимально выраженными побочными эффектами по данным литературы);
- у пациентов с иммунными нарушениями, например, нейтропенией, включать антибиотики только с бактериостатическим действием;
- при наличии в спектре возбудителей грамотрицательных микроорганизмов выбор делать в пользу антибиотиков, которые разрушают бактерии без высвобождения эндотоксина;
- в случае невозможности обеспечить эффективную антибактериальную терапию при микст-инфекции использовать комбинацию антибиотиков, избегая, по возможности, усиления токсического эффекта.

Согласно фармакологическому принципу необходимо учитывать достижение препаратом концентрации, превышающей МПК, в инфицированных тканях.

Исходя из вышеперечисленных принципов разработки химиотерапии, результатов исследования способности АБ разрушать биоплёнку, результатов определения МПК для бактерий в составе БП, определения частоты встречаемости отдельных видов и групп микроорганизмов, их чувствительности к антибактериальным препаратам предложено в случае, если возбудитель хирургической инфекции способен формировать БП, то в составе комплексного лечения использовать антибиотики согласно результатам микробиологического исследования. А для местного лечения гнойных ран использовать вакуум-промывной дренаж с применением 30% раствора димексида в качестве промывной жидкости [116].

3. При широком использовании антибиотиков наблюдается распространение устойчивости к ним в стационарах и формирование госпитальных изолятов, имеющих значительную эпидемиологическую опасность, отсюда при проведении антимикробной терапии необходимо учитывать уровень резистентности циркулирующих госпитальных изолятов. Поэтому отдают предпочтение антибиотикам, которые редко используются в данном лечебно-профилактическом учреждении, поскольку распространение устойчивости к антибиотикам не постоянно, а меняется в зависимости от того, как широко используется препарат. Обязательно учитывать этиологию заболевания и динамику изменения чувствительности к антибиотикам.

4. Экономические и социальные аспекты. Принимать во внимание доступность препаратов для данного лечебно-профилактического учреждения и стоимость лечения, а также доступность в аптечной сети.

5. Фармацевтический принцип. Учитывать срок годности препарата, условия его хранения, так как могут образовываться токсичные продукты деградации [117, 118].

## **4.2 Монотерапия**

Проведение монотерапии практически при любых инфекциях стало возможным с появлением новых высокоэффективных препаратов: фторхинолонов, карбапенемов, цефалоспоринов 5-го поколения, новых макролидов, аминогликозидов, фторхинолонов, тетрациклинов, линезолидов, обладающих очень высокой активностью и широким спектром действия. Высокая стоимость многих новых антибиотиков является сдерживающим фактором. Преимущества антимикробной монотерапии особенно очевидны при генерализованных, тяжело протекающих инфекциях: снижается риск побочных реакций, токсических реакций, снижается вероятность нарушения колонизационной резистентности. Вместе с тем высокая стоимость многих новых антибиотиков, возможность развития в случаях их длительного использования суперинфекции ограничивает возможность их широкого применения [115].

## **4.3 Комбинированное назначение антибактериальных препаратов**

Одновременное назначение двух и более антимикробных препаратов преследует три цели: 1) усиление антимикробного эффекта, 2) расширение спектра антимикробного действия, 3) снижение риска возникновения антибиотикоустойчивых изолятов микроорганизмов. Показанием к одновременному применению двух или более антибактериальных препаратов является:

- смешанная полимикробная аэробно–анаэробная инфекция, отсутствие средств, охватывающих весь спектр микроорганизмов, когда монотерапия неэффективна (интраабдоминальная инфекция, ожоги);
- тяжелые, генерализованные формы инфекции, когда возбудитель не установлен;
- инфекция у пациентов на фоне агранулоцитоза, первичного иммунодефицита при неустановленном возбудителе;
- усиление бактерицидного эффекта при наличии слабо чувствительных изолятов микроорганизмов за счет разного механизма действия антибактериальных препаратов;
- для потенцирования действия или защиты одного компонента

препарата другим, например, комплексный препарат ко–тримоксазол (триметоприм+сульфаметоксазол) – потенцирование эффекта; или сульбактам+ампициллин – сульбактам блокирует фермент  $\beta$ -лактазу микроорганизмов, защищая ампициллин, и тем самым значительно увеличивает его бактерицидный эффект;

- для уменьшения тяжести и частоты развития побочных реакций (микроорганизм сохраняет чувствительность к каждому из препаратов, если они применяются только в высоких дозах). В этом случае используют комбинацию препаратов в дозах ниже терапевтических;

- наличие биопленки.

Следует избегать необоснованного одновременного назначения двух и более антибактериальных средств.

Недостатки комбинированного лечения:

- подавление обычной флоры, увеличение риска колонизации устойчивыми микроорганизмами и развитие оппортунистических инфекций;

- увеличение частоты побочных эффектов;

- ослабление эффекта одного препарата другим или антагонизм между препаратами;

- увеличение стоимости лечения.

Комбинированное использование антибактериальных препаратов предполагает прежде всего учитывать их сочетаемость. Необходимо использовать такие комбинации, которые приводят к синергизму или суммированию антибактериального действия.

Наиболее оптимальной является комбинация двух бактерицидных или двух бактериостатических препаратов. Нельзя комбинировать бактерицидные и бактериостатические антибактериальные препараты, так как бактерицидные наиболее эффективны в отношении размножающихся микроорганизмов, а бактериостатические, подавляя размножение, защищают микроорганизмы от действия бактерицидных средств.

Комбинацию различных антибактериальных препаратов необходимо применять с осторожностью, поскольку они могут оказывать неблагоприятное воздействие на кровь, печень, почки и другие органы [113, 115, 119].

Совместное влияние двух или трех антибиотиков, в зависимости от механизмов их действия, может оказать суммарный (аддитивный), ниже суммарного (антагонистический) или выше суммарного (синергидный) эффекты [113, 115].

#### 4.4 Классификация антибиотиков

Антибиотики классифицируют (табл. 4.1, 4.2) и характеризуют по их происхождению, химической структуре, механизму действия, спектру активности (направленности ингибирующего действия) [40, 113, 115].

По происхождению различают антибиотики природные или естественные (получены из бактерий, грибов, животных, растений и т.п.), полусинтетические и синтетические.

По химической структуре среди антибиотиков имеются вещества ациклической, гетероциклической, ароматической, тетрациклиновой структуры,  $\beta$ -лактамы, макролиды, азалиды, антрацикоины, аминогликозиды, полипептиды и другие.

По направленности ингибирующего действия различают противобактериальные, противогрибковые, противовирусные, противопротозойные и противоопухолевые антибиотики.

По спектру действия различают:

- узкого спектра, подавляющие грам(+) и/или грам(–) кокки
- узкого спектра, подавляющие грам(–) бактерии
- широкого спектра, подавляющие грам(+) и грам(–) кокки, бактерии, риккетсии, хламидии и другие.

Таблица 4.1 – Классификация антибиотиков по действию на микробную клетку

Бактерицидные препараты	Бактериостатические
<ul style="list-style-type: none"> <li>– <math>\beta</math>-лактамы;</li> <li>– аминогликозиды;</li> <li>– хинолоны, включая фторхинолоны;</li> <li>– гликопептиды;</li> <li>– полимиксины;</li> <li>– полиены;</li> <li>– анзамицины;</li> <li>– бацитрацины;</li> <li>– фосфомицин;</li> <li>– триметоприм (медленное бактерицидное действие)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– макролиды (в зависимости от вида возбудителя и концентрации могут проявлять бактерицидный эффект);</li> <li>– тетрациклины;</li> <li>– линкозамиды;</li> <li>– хлорамфеникол (на пневмококк, менингококк и <i>Haemophilus influenzae</i> – бактерицидно);</li> <li>– сульфаниламиды;</li> <li>– фузидин (при <math>\uparrow</math> дозы бактерицидный эффект);</li> <li>– новобиоцин;</li> <li>– нитрофураны</li> </ul>

Таблица 4.2 – Классификация антибиотиков по механизму действия

Механизм действия	Группы препаратов
I. Ингибиторы синтеза клеточной стенки	$\beta$ -лактамы (пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы); гликопептиды; циклосерин; фосфомицин
II. Ингибиторы функций и структуры цитоплазматической мембраны	Полимиксины и бацитрацины Полиены

Механизм действия	Группы препаратов
III. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот:	
Ингибиторы матричных функций ДНК	Хлорохин и противоопухолевые АБ
Ингибиторы РНК-полимеразы (транскрипции)	Анзамицины (рифампицин), актиномицин
Ингибиторы ДНК-полимеразы (нарушение репликации ДНК)	Хинолоны (включая фторхинолоны – вызывают суперспирализацию ДНК), нитрофураны; производные нитроимидазола; новобиоцин
Нарушение синтеза ДНК	Производные хиноксалина
IV. Ингибиторы синтеза белка (нарушают сборку белка на рибосомах):	
– нарушают последовательность аминокислот в пептидной цепочке (необратимо связываясь с 30S субъединицей рибосом)	Аминогликозиды и тетрациклины
– торможение синтеза белка в начале сборки пептидной цепи (связываются с 50S субъединицей рибосом)	Линкозамиды
– нарушение образования пептидных связей (блокирует пептидил-трансферазную р-цию, связываясь с 50S субъединицей рибосом)	Хлорамфеникол (левомицетин)
– нарушение транспорта аминокислот к рибосомам (ингибирует связывание аминоацил-т-РНК с рибосомами)	Тетрациклины
– ингибирует трансляцию белка у бактерий за счет связывания с 30S-субъединицей рибосом, блокирует молекулы аминоацил-тРНК	Тигециклин
– нарушение наращивания пептидной цепи на рибосомах (связываются с 50S субъединицей рибосом)	Макролиды
– предотвращают связывание аминоацил-тРНК (образует устойчивый комплекс фузидин-GDP-рибосома-EFG или EF <sub>2</sub> )	Фузидин
– связывается с бактериальными рибосомами, предотвращает образование функционального иницирующего комплекса 70S – важного компонента процесса трансляции при синтезе белка	Линезолид
V. Модификаторы энергетического метаболизма (антиметаболиты):	
– ингибиторы синтеза фолиевой кислоты	Сульфаниламиды
– ингибиторы дигидрофолат-редуктазы	Триметоприм
– антагонист пиридоксина, антибактериальное действие за счет хелатирования металлов	Изониазид

## 5. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

### 5.1 Группа пенициллинов

#### 5.1.1 Первое поколение пенициллинов (природные пенициллины)

**Механизм действия.** Подавляют биосинтез пептидогликана клеточной стенки (муреина) во время митоза клетки, связываясь с ПСБ. Основным среди ПСБ является транспептидаза, опосредующая соединение аланина и глицина на терминальных участках пептидной цепи. Молекулы пенициллинов структурно гомологичны ацил-D-аланил-D-аланину и связывают его. Пенициллины также связывают другие ПСБ, включая карбоксипептидазы. Вновь образующиеся клетки, лишенные клеточной стенки, разрушаются за счет инактивации транспептидаз и активации аутолитических энзимов. Пенициллины могут также нарушать синтез адгезинов – белков, обеспечивающих связывание бактерий с клетками макроорганизма. Оказывают бактерицидное действие только на размножающиеся микроорганизмы.

**Спектр действия.** *Грам(+)* бактерии (стафилококк, стрептококк группы А, пневмококк, возбудитель сибирской язвы, дифтерии), *грам(-)* бактерии (менингококки, гонококки, протей, спирохеты, *Pasteurella multocida*, анаэробные кокки, бактероиды, лептоспиры). Резистентность к пенициллинам госпитальных изолятов достигает 100%. Устойчивы к действию природных пенициллинов *грам(-)* бактерии (энтеробактерии, коклюшные, синегнойные палочки, клебсиелла, гемофильная палочка, легионелла), а также стафилококки, вырабатывающие фермент β-лактамазу (пенициллиназу).

**Бензилпенициллина натриевая соль**  $T_{1/2}$  – 30 мин. (*penicillin G*) – флаконы по 250 тыс. ЕД, 500 тыс. ЕД, 1000 тыс. ЕД, 5000 тыс. ЕД. ССД – 6000 тыс. ЕД (по 1000000 / 4 часа). МСД – 40000000 ЕД и более. Вводится внутримышечно, внутривенно, внутриартериально. Внутривенно – по 60–80 капель в 1 мин. на 5–10% глюкозы или 0,9% растворе NaCl. При заболевании глаз 20–100 тыс. ЕД Na-соли в 1 мл по 1–2 капли / 6–8 раз в день. ССД 18–30 млн ЕД применяют при лечении тяжелых инфекций – менингита (плохо проникает через ГЭБ), инфекционного эндокардита, газовой гангрены. Дозы 8–12 млн ЕД применяют при лечении аспирационной пневмонии, абсцесса легких, вызванных стрептококками группы А, а комбинации с аминогликозидами – при лечении энтерококковой инфекции. Малые дозы 2–6 млн. ЕД применяют при лечении пневмококковой пневмонии.

**Бензилпенициллина калиевая соль.** Формы выпуска и дозировки те же. Нельзя вводить внутривенно и эндолумбально!

**Феноксиметилпенициллин** (*penicillin V*)  $T_{1/2}$  – 1 ч. **Форма выпуска** – таблетки по 0,1 и 0,25 г, драже 0,1 г, порошок для суспензий во флаконах по 1,2; 0,6; 0,3. Применяется *per os*, как правило, при инфекции средней

тяжести за  $\frac{1}{2}$ –1 час до еды (не инактивируется желудочным соком, 0,5 г его = 300 тыс. ЕД пенициллина внутримышечно) 4–6 раз в сутки. ССД – 1–2 г, МСД – 3 г. Показан при стрептококковых инфекциях легкой и средней тяжести (инфекции кожи и мягких тканей, тонзиллитах и фарингитах, бронхите).

*Бензатин–феноксиметилпенициллин* (оспен) – производное феноксиметилпенициллина. Выпускается – таблетки по 250 и 500 тыс. ЕД; суспензия 750 тыс. ЕД/5 мл. ССД 3 млн ЕД/сутки 3–4 раза в день *per os*. По сравнению с ним более стабилен в ЖКТ, быстрее всасывается, лучше переносится. Показания см. феноксиметилпенициллин.

*Дюрантные препараты* (депо–пенициллины) показаны для профилактики и лечения сифилиса, гонореи, ревматизма, рецидивирующей рожи.

*Бензилпенициллина новокаиновая соль* (новоциллин, прокаинпенициллин) – флаконы по 300000, 600000, 1,2 млн. ЕД. Вводится только внутримышечно 4 раза в день по 1 млн ЕД, оказывает продленное действие (24 часа). ССД– 600 тыс. ЕД, МСД – 1,2 млн ЕД.

*Бициллин–1* (бензатинпенициллин, ретарпен, экстенциллин) содержит дибензилэтилендиаминовую соль бензилпенициллина. Выпускается – флаконы по 300 тыс., 600 тыс., 1,2 млн, 2,4 млн ЕД; пролонгированная депо–форма (концентрация препарата в крови от нескольких дней до 4 недель после внутримышечного введения). Используется чаще для химиопрофилактики 1,2–2,4 млн ЕД только внутримышечно 1 раз в 1–2–4 нед.

*Бициллин–3* (бензилпенициллина калиевая соль, бензилпенициллина новокаиновая соль и бензатинпенициллин в равных количествах) – флаконы по 300 тыс., 600 тыс., 900 тыс., 1,2 млн ЕД, вводится только внутримышечно по 600 тыс. ЕД или 1,2 млн ЕД 1 раз в неделю.

*Бициллин–5* (1 часть бензилпенициллина новокаиновой соли и 4 части бензатинпенициллина) – флаконы по 1,5 млн ЕД только для внутримышечного введения взрослым 1 раз в 4 нед. Дети < 30 кг 600 тыс. ЕД, более 30 кг – 900 тыс. – 1,2 млн ЕД 1 раз в мес. Показан для профилактики ревматизма и рецидивирующей рожи.

### *5.1.2 Второе поколение пенициллинов (изоксазолпенициллины, полусинтетические пенициллиназоустойчивые антистафилококковые антибиотики)*

Получено путем добавления к 6–аминопенициллановой кислоте ацильной боковой цепи.

*Механизм действия.* Наличие боковой ацильной цепи защищает  $\beta$ –лактамное кольцо антибиотиков от воздействия  $\beta$ –лактамазы, поэтому являются препаратами выбора при лечении стафилококковой инфекции.

*Спектр действия.* Препараты 2–го поколения имеют узкий спектр действия, активны преимущественно в отношении грам(+) микроорганизмов, включая изоляты, продуцирующие пенициллиназу

(активны в отношении бактерий, чувствительных к пенициллину), и предназначены для лечения пациентов с инфекцией пенициллиназопродуцирующими стафилококками (септицемии, пневмонии, абсцессы, флегмоны, остеомиелит, раневая инфекция). Экскреция осуществляется главным образом печенью. С белками плазмы связывается более 90% препарата.

*Оксациллин* (простафлин)  $T_{1/2}$  – 0,5–0,7 ч. *Форма выпуска* – флаконы по 0,25 и 0,5 г; таблетках и капсулах по 0,25 и 0,5 г. Внутривенно, внутримышечно, *per os* 1–2 г/ 4–6 ч. ССД – 6 г. МСД – 18 г. Плохо всасывается при приеме *per os* и назначается за 1–1,5 часа до еды. Продолжительность лечения – 7–10 дней, при тяжелой инфекции (сепсис, эндокардит и др.) – 2–3 недели и более. Показан при лечении инфекций, вызванных PRSA. Препарат выбора при лечении стафилококковых инфекций, вызванных не MRSA.

### 5.1.3 Третье поколение пенициллинов (аминопенициллины, полусинтетические пенициллины широкого спектра действия)

*Спектр действия.* Аминопенициллины – препараты широкого спектра действия. Активно подавляют грам(–) бактерии. В отношении грам(+) бактерий активность их ниже, чем у бензилпенициллина, но несколько выше, чем у пенициллинов 2-го поколения. Исключение составляют стафилококки, продуцирующие  $\beta$ -лактамазу, на которые пенициллины широкого спектра не действуют.

*Ампициллин* (пентрексил, омнипен) –  $\alpha$ -аминобензил–пенициллин;  $T_{1/2}$  – 75 мин. Активен против грам(+) и многих грам(–) микроорганизмов; может использоваться и при смешанной инфекции. Устойчивы – синегнойная палочка, пенициллиназообразующие стафилококки (разрушается стафилококковой пенициллиназой); изоляты вульгарного протей, *Providencia spp.*

*Форма выпуска* – таблетки, капсулы по 0,25 г и во флаконах по 0,25 и 0,5 г; флаконы по 5 г для приготовления суспензии. Применяется *per os*, внутримышечно, внутривенно 0,25–0,5 г/ 4–6 ч. ССД – 4–6 г. МСД – 12 г. Необходимо использовать только свежеприготовленные растворы (вода для инъекций или физраствор; не хранить > 1 часа). Показан при инфекции нижних и верхних дыхательных путей, мочевыводящих путей, менингите, холецистите, кишечных инфекциях (шигеллез, сальмонеллез), хирургических инфекциях в амбулаторной практике, как средство профилактики гнойно-воспалительных осложнений.

*Амоксициллин* (амоксил)  $T_{1/2}$  – 1–1,3 ч. Является активным метаболитом ампициллина. Абсорбируется в кишечнике (концентрации препарата в нижних отделах ЖКТ низкие), обладает улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с ампициллином. *Форма выпуска* – таблетки, капсулы, сироп, флаконы для инъекций. Назначают *per os* 0,25–0,5 г/8 ч.; ССД 1,5–3 г; МСД – 6 г. Парентерально по 0,5–1,0 г/6–8 ч.; при острой гонорее – 3,0 г однократно.



*Ампиокс* – комбинация ампициллин + оксациллин (*per os* 1:1; Парентерально – 2:1). Сочетает спектры действия обоих антибиотиков (широкий спектр ампициллина и антистафилококковую активность оксациллина). Выпускается в таблетках, капсулах для приема *per os* по 0,25 г и во флаконах по 0,1; 0,2 и 0,5 г. Назначается *per os*, внутривенно, внутримышечно / 6 ч. ССД – 4 г; МСД – 8 г. Внутривенно капельно в 100–200 мл 5–10% глюкозы или 0,9% растворе NaCl 60–80 капель в 1 мин. Показан при инфекциях смешанной этиологии.

#### 5.1.4 Четвертое поколение пенициллинов (карбоксипенициллины)

*Спектр действия.* Грам(+) бактерии, которые чувствительны к пенициллину, и грам(–) бактерии, чувствительные к ампициллину, действует на синегнойную палочку и протей. Устойчивы пенициллиназопродуцирующие стафилококки, возбудители газовой гангрены, столбняка, простейшие, риккетсии, спирохеты, грибы. Препараты плохо проникают через ГЭБ, а карбенициллин и тикарциллин практически не всасываются из ЖКТ.

*Карбенициллин* (пиопен)  $T_{1/2}$  – 75 мин. Активен в отношении некоторых видов псевдомонад, протей и кишечной палочки; не показан при инфекциях, вызванных грам(+) бактериями. Устойчивы простейшие, спирохеты, риккетсии. *Форма выпуска* – флаконы по 1 г. Внутривенно, внутримышечно / 6 ч. ССД внутривенно – 20 г, МСД – 30 г. ССД внутримышечно – 4 г, МСД – 8 г. Вводят парентерально при системных инфекциях внутривенно 50–100 капель в 1 мин.

*Тикарциллин* (тикар)  $T_{1/2}$  – 1–1,2 ч. По активности сходен с карбенициллином, но более чем в 4 раза активнее в отношении синегнойной палочки. Разрушается  $\beta$ -лактамазами. Вводится внутривенно 3 г / 4–6 часов, ССД – 200–300 мг/кг, МСД – 24 г. Внутримышечно / 6–8 часов, ССД – 50–100 мг/кг, МСД – 8 г.

#### 5.1.5 Пятое поколение пенициллинов (уреидо- и пиперазинопенициллины)

К молекуле ампициллина присоединена боковая цепь с остатком мочевины. *Механизм действия.* Проникают через стенки бактерий, подавляют их синтез, но разрушаются  $\beta$ -лактамазами.

*Спектр действия.* Препараты обладают бактерицидным действием; особенно эффективны в отношении синегнойной палочки. Экскретируются через почки и печень. Вводятся только парентерально.

*Пиперациллин* (пипрацил) имеет в структуре пиперазиновую группировку и относится к пиперазино-пенициллинам. Выпускается во флаконах 2,0; 3,0; 4,0 г. Вводится внутривенно 3–4 г / 4–6 ч., ССД – 12–16 г (200–300 мг/кг/сутки), МСД – 24 г (500 мг/кг/сутки). внутримышечно / 6–12 ч., ССД – 6–8 г, МСД – 24 г. Самый активный препарат этой группы, спектр действия близок к карбенициллину, более активен в отношении *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *H. influenzae*, *Neisseria spp.*

### 5.1.6 Шестое поколение пенициллинов (амидинопенициллины)

*Спектр действия:* грам(–) бактерии, в том числе устойчивые к ампициллину. Лучше проникают через ГЭБ и внутрь клеток, не активны в

*Антипсевдомонадные пенициллины* являются сборной группой на основании спектра действия.

- *Карбенициллин, Карфециллин, Тикарциллин* – 4-е поколение пенициллинов.

- *Мезлоциллин, Пиперациллин, Азлоциллин* – 5-е поколение пенициллинов.

*Спектр действия.* Активны против псевдомонад, некоторых ампициллинустойчивых грам(–) бактерий (энтеробактер, индол(+)) изолятов протей и морганелл). Высокоактивны против грам(–) неспорообразующих анаэробов. Малоактивны против грам(+) кокков.

По антисинегной активности препараты можно расположить так: карбенициллин < азлоциллин < пиперациллин.

*Показаны* при синегнойной инфекции, часто в сочетании со 2-ым и 3-им поколением (нельзя смешивать в одном шприце); анаэробной, неспорообразующей инфекции (уступают по антимикробной активности метронидазолу, хлорамфениколу, клиндамицину и комбинации ампициллин + сульбактам).

### 5.1.7 Комбинации пенициллинов и ингибиторов $\beta$ -лактамаз

В связи с увеличением числа бактерий, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы, и возрастанием роли этих микроорганизмов в патологии человека были разработаны потенцированные пенициллины. Помимо пенициллинового кольца, эти препараты включают ингибиторы  $\beta$ -лактамаз.

*Клавулановая кислота* – производное  $\beta$ -лактам, продуцируемое *Streptomyces clavuligerus*. Связывает и подавляет  $\beta$ -лактамазу (пенициллиназу), конкурентно защищает пенициллины.

*Сульбактам* – сульфон пенициллановой кислоты, с ограниченной антибактериальной активностью. Необратимо подавляет большинство  $\beta$ -лактамаз, ответственных за устойчивость многих видов бактерий к пенициллинам и цефалоспорином, а также инактивирует некоторые ПСБ.

*Тазобактам* – ингибитор  $\beta$ -лактамаз.

Наиболее известны комбинации пенициллинов и ингибиторов  $\beta$ -лактамаз:

*Амоксициллин + клавуланат* (аугментин, амоксиклав) оказывает эффективное бактерицидное воздействие на большинство аэробных бактерий: *S. aureus*, *KOC*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* и анаэробные бактерии, включая бактериоиды, продуцирующие  $\beta$ -лактамазу.

*Форма выпуска* – во флаконах: амоксициллин по 500 или 1000 мг + клавулановая кислота по 100 или 200 мг; амоксициллин по 250 мг +

клавулановая кислота по 125 мг или по 625 мг в таблетках; сироп по 156 мг (125 мг амоксициллина + 31,25 мг клавуланата на каждые 5 мл) или по 312 мг на 5 мл. Назначается *per os* по 1–2 таблетки 3 раза в сутки; ВВ медленно капельно в течение 30–40 мин. по 600–1200 мг в 5–100 мл раствора для инфузий через 6–8 ч. Показан для лечения инфекций дыхательных и мочевых путей, кожи и мягких тканей, остеомиелита, септицемии, перитонита и послеоперационных осложнений, профилактики послеоперационных гнойно-воспалительных заболеваний (1,2 г перед операцией).

*Тикарциллин + клавуланат* (тиментин, зосин)  $T_{1/2}$  – 66 мин. Высоко эффективен против  $\beta$ -лактамазо-продуцирующих и  $\beta$ -лактамазо-негативных изолятов грам(–) бактерии (псевдомонады, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*; некоторые изоляты энтеробактера, ацинобактера, серраций, клебсиелл, цитробактера, нейссерий, сальмонелл, *H. influenzae*, *Branhamella catarrhalis*), а также большинства грам(+) бактерий (*S. aureus*, КОС, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. bovis*, *E. faecalis*, зеленеющих стрептококков). Активен против анаэробных микроорганизмов: бактериоидов, включая *B. fragilis*; клостридий, в том числе *C. difficile*, *C. sporogenus*; некоторых видов родов *Eubacter*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*.

*Форма выпуска* – флаконы, содержащие соответственно 3 г + 100 мг препарата. ССД при инфекциях средней степени тяжести 200 мг/кг 4 раза; в более тяжелых случаях – 300 мг/кг 6 раз в сутки. Препарат вводят внутривенно струйно на 13 мл воды для инъекций или 0,9% NaCl, а также внутривенно капельно на 5% растворе глюкозы или 0,9% NaCl. Применяют при инфекциях, вызванных полимикробной флорой: бронхиты, пневмонии; инфекции мочевыводящих путей; абдоминальные инфекции; инфекции малого таза; инфекции кожи мягких тканей; инфекции костей и суставов; сепсис. Курс лечения – 10–14 дней и более.

*Ампициллин + сульбактам* (уназин, сулациллин, сультамициллин) содержит натрия сульбактам + ампициллин (1:2). Спектр действия – все микроорганизмы, чувствительные к ампициллину: стафилококки (включая пенициллиназо-продуцирующие), пневмококк, энтерококк, отдельные виды стрептококков, гемофильная палочка, анаэробы, кишечная палочка, клебсиелла, энтеробактер, нейссерии. Не активен в отношении: *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, ряда изолятов родов *Enterobacter*, *Morganella*, *Providencia*, *Serratia*. Применяется внутривенно, внутримышечно. Выпускается во флаконах по 10 мл – 0,75 г вещества, 20 мл – 1,5 г и 20 мл – 3 г и таблетках по 375 мг. Разводится водой для инъекций или 5% глюкозой, вводится внутривенно медленно струйно в течение 3 мин. или капельно в течение 15–30 мин. ССД от 1,5 до 12 г / 6–8 ч. МСД – 12 г. Показан для лечения хирургических и гинекологических инфекций.

*Пиперациллин + тазобактам* (тазоцин),  $T_{1/2}$  – 36–72 мин. Тазобактам усиливает действие пиперациллина на грам(–) и анаэробные бактерии,

обеспечивает его активность в отношении микроорганизмов, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы; предупреждает устойчивость *E. coli*, *K. pneumoniae* к цефотаксиму и цефтазидиму. Препарат активен в отношении грам(–) аэробных (*E. coli*, цитробактера, клебсиелл, энтеробактера, протей, псевдомонад, гонококка, гемофильной палочки) и анаэробных (бактероиды, фузобактерии) бактерий; грам(+) – слабая активность против стрептококков, энтерококков, стафилококков. Связывание с белками плазмы 16%, хорошо проникает в ткани, включая костную и предстательную железу, при менингите через ГЭБ. Выводится в основном почками в неизмененном виде. Содержится во флаконах 2,25 (2 и 0,25 г соответственно) и 4,5 г (4 и 0,5 г). Разводится водой для инъекций, физраствором или 5% раствором декстрозы, вводится внутривенно струйно или капельно в течение 30 мин. ССД – 12 г для пиперациллина и 1,5 для тазобактама / 6ч (при гемодиализе – 2,25 г тазоцина /8 часов). Курс лечения – 7–10 дней. Показан при лечении инфекционно–воспалительных заболеваний среднетяжелого и тяжелого течения: бактериальные инфекции нижних отделов дыхательных путей; интраабдоминальные инфекции; неосложненные и осложненные инфекции кожи и мягких тканей; инфекции малого таза, включая эндометрит; бактериальная септицемия; инфекции у пациентов с нейтропенией; смешанные инфекции, вызванные аэробной и анаэробной флорой.

## 5.2 Группа цефалоспоринов

*Механизм действия.* Нарушают синтез клеточной стенки за счет ацетилирования мембранных транспептидаз. В основе их химической структуры лежит 7-аминоцефалоспориновая кислота. Продуценты природных цефалоспоринов – грибы рода *Cephalosporium* (*C. acremonium*, *C. salmosynnematum* и др.) – оказывают бактерицидное действие.

*Спектр действия:* грам(+) – стрептококки, стафилококки, включая продуцирующие пенициллиназу, пневмококки, дифтерийная и сибиреязвенная палочки, возбудители газовой гангрены, столбняка и грам(–) бактерии – менингококки, гонококки, трепонемы, боррелии, кишечная палочка, шигеллы, сальмонеллы, клебсиеллы, отдельные виды протей.  $\beta$ -лактамное кольцо более резистентно (по сравнению с пенициллинами) к действию  $\beta$ -лактамаз и более защищено от воздействия микробных энзимов. Низкая активность в отношении энтерококков, листерий, *MRSA*. Наблюдается синергизм с аминогликозидами. Наиболее распространена классификация, отражающая последовательность их внедрения. Выделяют также цефалоспорины для парентерального применения и приема *per os*.

### 5.2.1 Первое поколение цефалоспоринов для парентерального применения

**Спектр действия.** Высокоактивны против грам(+) кокков:  $\alpha$ - и  $\beta$ -гемолитический стрептококк, пневмококк. Устойчивы к стафилококковой  $\beta$ -лактамазе (в случае интенсивной продукции фермента ряд изолятов может проявлять устойчивость); гидролизуются  $\beta$ -лактамазой грам(-) бактерий, поэтому при длительном и частом применении активность против грам(-) флоры снижается. Менее активны в отношении грам(-) палочек (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*). Не действуют на риккетсии, вирусы, грибы, простейшие. Хорошо проникают во все ткани, легко проходят через плаценту, не проникают через ГЭБ.

**Применяют** при инфекциях, вызванных чувствительными микроорганизмами: инфекции дыхательных путей, септицемии, эндокардите, остеомиелите, гнойно-воспалительных заболеваниях, инфицированных ожогах, перитоните, инфекциях мочевых путей и др., а также для профилактики послеоперационных осложнений.

**Цефазолин** – препарат широкого спектра действия, влияет бактерицидно на грам(+) и грам(-) бактерии (включая стафилококки, образующие пенициллиназу, гемолитические стрептококки, пневмококки, сальмонеллы, шигеллы, индол(-) изоляты протей, клебсиеллы, палочки дифтерии, гонококки, анаэробы). Не действует на MRSA, энтерококки, листерии,  $\beta$ -лактамазопозитивные изоляты *H. influenzae*, псевдомонады.  $T_{1/2}$  – 1,4–1,8 ч. **Форма выпуска** – флаконы по 0,25; 0,5; 1; 2 и 4 г. Вводится по 0,5–2 г внутривенно, внутримышечно / 6–8 ч. ССД – 3–4 г (при тяжелых инфекциях до 100 мг/кг), МСД – 8 г. С целью профилактики 1,0–2,0 г за 0,5–1 час до операции. Нельзя применять для лечения менингита (плохо проникает через ГЭБ).

**Цефалотин** – препарат широкого спектра действия, влияет бактерицидно на грам(+) (стафилококки, не продуцирующие и продуцирующие пенициллиназу; стрептококки, пневмококки, палочки дифтерии, сибирской язвы), и грам(-) бактерии (менингококки, гонококки, шигеллы, сальмонеллы, клебсиеллы). Активен также в отношении спирохет, лептоспир. Неэффективен в отношении синегнойной палочки, индолположительных изолятов протей, микобактерий туберкулеза, анаэробных микроорганизмов. **Форма выпуска** – флаконы по 0,5 г. Вводится в/м и в/в в дозе 0,5–1,0 г каждые 4–6 часов. При тяжелом течении инфекции доза препарата может быть увеличена до 2 г каждые 4 часа.

### 5.2.2 Оральные цефалоспорины первого поколения

**Цефалексин** по спектру действия близок к ампициллину, высокоактивен против стафилококков, стрептококков, кишечной палочки, клебсиеллы, менее – гемофильной палочки, моракселлы; более устойчив к  $\beta$ -лактамазам.  $T_{1/2}$  – 0,6–0,8 ч. **Форма выпуска** – капсулы по 0,25 и 0,5 г и порошок по 0,25 для суспензий. Применяется по 0,25–0,5 г *per os* / 6 часов

за 1–1,5 часа до еды; ССД – 1–2 г, МСД – 4 г. Показан при стрептококковых и стафилококковых инфекциях кожи и мягких тканей, дыхательных путей (особенно стрептококковые), мочевыводящих путей (вызванных *E. coli*, *P. mirabilis*). Не использовать при отитах и синуситах, так как обладает низкой активностью против гемофильной палочки и плохо проникает в эти очаги.

### 5.2.3 Второе поколение цефалоспоринов

**Спектр действия.** Высокоактивны против грам(–) бактерий, а также гонококков, нейссерий, энтеробактерий, серраций, бактероидов. Резистентны к нескольким или ко всем образующимся β-лактамазам и к нескольким хромосомальным β-лактамазам, продуцируемым грам(–) бактериями. Не активны также в отношении псевдомонад. Менее активны, чем цефалоспорины 1-го поколения, в отношении грам(+) микроорганизмов.

**Цефуроксим-натрий** (кетоцеф, зинацеф, кефурокс) активен против грам(+) флоры и анаэробов, более активен, чем цефалоспорины 1-го поколения, против грам(–) флоры (*E. coli*, *P. mirabilis*, *M. catarrhalis*, сальмонелл, шигелл, клебсиелл, *H. influenzae*); не активен в отношении псевдомонад, кампилобактера, серраций, ацинетобактера, индол(+) изолятов протей. **Форма выпуска** – флаконы по 0,75 г и 1,5 г. Вводится в/в или в/м по 0,75–1,5 г после разведения / 6–8 ч.; ССД – 6 г, МСД – 9 г. Показан при инфекциях дыхательных путей, мочевыводящих путей, костей, суставов и др. С целью профилактики вводят ВВ 1,5 г за 0,5–1 час до операции.

**Цефокситин** действует бактерицидно, нарушая синтез клеточной стенки микроорганизма. Имеет широкий спектр действия. Активен в отношении *S. aureus* и *S. epidermidis*, *E. coli*, *H. influenzae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp., *P. mirabilis*, *N. gonorrhoeae*, *Eikenella corrodens*, *N. gonorrhoeae*, *M. morganii*, *P. vulgaris*, *Providencia* spp.. Активен в отношении анаэробных организмов: *P. niger*, *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *B. fragilis*. Устойчив к действию β-лактамаз.  $T_{1/2}$  – 41–59 мин. **Форма выпуска** – флаконы 1 г. Средняя доза для взрослых – 1–2 г каждые 6–8 ч.

### 5.2.4 Третье поколение цефалоспоринов

**Спектр действия.** Высокоактивны против грам(–) флоры: по отношению к изолятам вульгарного протей, род *Providencia*. Превосходят 1–2 поколения по активности в отношении *Enterobacteriaceae*. Не всегда активны против серраций, энтеробактера, ацинетобактера, бактероидов и других анаэробов. Малоактивны в отношении грам(+) кокковой флоры сравнительно с цефалоспоринами 1-го поколения. По антипсевдомонадной активности разделяют на две группы: с умеренной активностью (цефотаксим, латамоксеф, цефтизоксим, цефтриаксон) и высокой активностью (цефоперазон, цефтазидим, цефсулодин). Устойчивы к

действию плазмидных  $\beta$ -лактамаз широкого спектра грам(–) микроорганизмов (у отдельных препаратов варьирует), но разрушаются хромосомными  $\beta$ -лактамазами грам(–) микроорганизмов.

*Цефалоспорины третьего поколения* показаны при госпитальных инфекциях, вызванных грам(–) флорой, тяжелых инфекциях нижних дыхательных и мочевыводящих путей, менингите, инфекциях интраабдоминальной и тазовой области, инфекциях кожи и мягких тканей, костей и суставов, грам(–) сепсисе. Возможно сочетание при тяжелых инфекциях (особенно анаэробных) с аминогликозидами 2-го и 3-го поколения и метронидазолом.

*Цефотаксим* (клафоран)  $T_{1/2}$  – 1 ч. Высокоактивен в отношении грам(–) микроорганизмов – кокков (гонококки, менингококки, *M. catarrhalis*, включая изоляты, вырабатывающие  $\beta$ -лактамазы) и бактерий (кишечная и гемофильная палочка, протей, провиденсия, энтеробактер, клебсиеллы, ацинетобактер, серрации, цитробактер и др.). Среди грам(+) кокков чувствительны стрептококки (кроме энтерококков), антистафилококковая активность слабая.

*Форма выпуска* – флаконы по 1 и 2 г. Внутривенно, внутримышечно 1–2 г/ 6–12 ч. ССД – 4 г, МСД – 12 г. Внутривенно по 1–2 г вводят в течение 3–5 мин., растворив 2 г препарата в 40 мл воды для инъекций. При менингите 8–12 г/сутки 4–6 раз в день. Применяют при инфекционных заболеваниях дыхательных путей, почек и мочевыводящих путей, костей, суставов, мягких тканей, кожи, перитоните, инфекциях уха, горла, носа и др.

*Цефтриаксон* (лонгацеф, роцефин)  $T_{1/2}$ –6,5–8,6 ч. Активен против многих грам(–) и грам(+) микроорганизмов, устойчив к действию  $\beta$ -лактамаз. Устойчивы 10% изолятов *S. aureus*, многие изоляты *P. aeruginosa*, 15–50% изолятов *B. fragilis*. Связывание с белками плазмы – 58–95%. В течение 24 часов остается в бактерицидной концентрации в тканевой жидкости.

*Форма выпуска* – флаконы по 1,0 (для внутримышечного введения 1% лидокаин и вода для инъекций для внутривенного введения). Применяется по 1–2 г внутривенно, внутримышечно / 12– 24 ч. ССД – 2 г, МСД – 4 г.

*Цефодизим* (модивид)  $T_{1/2}$ – 1,8 ч. Метаболизируется, выводится через почки. Вводится внутривенно, внутримышечно по 1 г 2 раза в сутки ССД – 2–4 г; МСД – 8 г.

*Цефоперазон* (цефобид)  $T_{1/2}$  – 1,2 ч. Действует на псевдомонады и *Acinetobacter spp.*, но слабее, чем цефтазидим. Хорошо выделяется с желчью и мочой, но хуже проникает через ГЭБ. *Форма выпуска* – флаконы по 1,0 и 2,0 г. Вводится внутривенно, внутримышечно 2–6 г / 6–12 ч., ССД– 4–8 г, МСД – 12 г. Выпускается комбинированный препарат *цефоперазон + сульбактам*.

*Цефтазидим* (кефадим, фортум)  $T_{1/2}$ – 1,8 ч. Широкого спектра действия; эффективен против грам(+) и грам(–) микроорганизмов, устойчив к действию

большинства  $\beta$ -лактамаз, не эффективен против псевдомонад, микоплазм, хламидий. В отношении *P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp.* более активен, чем цефоперазон, цефсулодин, пиперациллин. В отношении энтеробактерий так же активен, как цефотаксим. В отношении грам(+) бактерий в 2 раза менее активен, чем цефотаксим. Устойчивы многие изоляты *B. fragilis*. Менее активен против грам(+) кокков. Наличие резистентных изолятов связывают с продукцией  $\beta$ -лактамаз ТЕМ-3. Описана селекция ванкомицин-резистентных *E. faecium* при применении цефтазида. Выпускается во флаконах по 0,25, 0,5, 1 и 2 г. Вводится внутривенно, внутримышечно 1–2 г/ 8–12 ч. ССД– 2 г, МСД – 6 г.

#### 5.2.5 Четвертое поколение цефалоспоринов

*Цефепим* (максипим) состоит из цефепима гидрохлорида и L-аргинина (стабилизирует рН – 4,0–6,0) и обладает широким спектром действия в отношении различных грам(+) и грам(–) бактерий, в том числе изолятов, резистентных к аминогликозидам или цефалоспориновым антибиотикам 3-го поколения; высоко устойчив к гидролизу большинством  $\beta$ -лактамаз, обладает малым сродством в отношении  $\beta$ -лактамаз, кодируемых хромосомными генами. Чувствительны грам(+) аэробы: *S. aureus* и *S. epidermidis* (включая изоляты, продуцирующие  $\beta$ -лактамазу); другие изоляты стафилококков, включая *S. hominis*, *S. saprophyticus*; *S. pyogenes* (стрептококки группы А); *S. agalactiae* (группы В); *S. pneumoniae*;  $\beta$ -гемолитические стрептококки (группы С, G, F), *S. bovis* (группа D). Резистентны зеленящие стрептококки (энтерококки), метициллин резистентные стафилококки, грам(–) аэробы: *Pseudomonas spp.*, включая *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. stutzeri*; *E. coli*, *Klebsiella spp.*, включая *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *Enterobacter spp.*, включая *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. sakazakii*; *Proteus spp.*, включая *P. mirabilis*, *P. vulgaris*; *Acinetobacter calcoaceticus*; *Aeromonas hydrophila*; *Capnocytophaga spp.*; *Citrobacter spp.*, включая *C. diversus*, *C. freundii*; *Campylobacter jejuni*; *Cardnerella vaginalis*; *Haemophilus ducreyi*; *H. influenzae* (включая изоляты, продуцирующие  $\beta$ -лактамазу); *Haemophilus parainfluenzae*; *Hafnia alvei*; *Legionella spp.*; *M. morganii*; *B. catarrhalis*; *Neisseria meningitidis*; *Providencia spp.* (включая *P. retigeri*, *P. stuartii*); *Salmonella spp.*; *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*; *Shigella spp.*; *Yersinia enterocolitica*. Не активен в отношении некоторых изолятов *Xanthomonas maltophilia*. Чувствительны анаэробы: *Bacteroides spp.*, включая *B. melaninogenicus* и другие микроорганизмы ротовой полости, относящиеся к *Bacteroides*; *Clostridium perfringens*; *Fusobacterium spp.*; *Mobiluncus spp.*; *Peptostreptococcus spp.*; *Veillonella spp.* Не активен в отношении *B. fragilis* и *C. difficile*.

Форма выпуска – флаконы по 500 мг, 1 г, 2 г. Доза > 13 лет – 1 г, вводится внутривенно или внутримышечно /12 ч.; обычный курс – 7–10 дней. Инфекции мочевого тракта легкой и средней тяжести: 500 мг – 1 г в/в или в/м/12 ч. Другие инфекции легкой и средней тяжести: 1 г внутривенно



или внутримышечно / 12 ч. Тяжелые инфекции: 2 г внутривенно / 12 ч. Очень тяжелые и угрожающие жизни инфекции: 2 г внутривенно / 8 ч. внутривенно капельно вводят на 5–10 мл стерильной воды для инъекций, 5% растворе глюкозы или 0,9% растворе NaCl медленно в течение 3–5 мин. или в системе для внутривенных вливаний. МСД – 16 г.

Показан при инфекциях нижних дыхательных путей, включая пневмонию и бронхит; инфекциях мочевых путей, инфекциях кожи и кожных структур; интраабдоминальных инфекциях, включая перитонит и инфекции желчных путей; гинекологических инфекциях; септицемии; эмпирическое лечение при фебрильной нейтропении.

#### 5.2.6 Пятое поколение цефалоспоринов

Цефалоспорины 5 поколения действуют бактерицидно, нарушая синтез клеточной стенки микроорганизмов. Обладают широким спектром действия в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, изолятов, резистентных к аминогликозидам и цефалоспориновым антибиотикам 3 поколения. Высокоустойчивы к гидролизу большинства бета-лактамаз и быстро проникают в грамотрицательные бактериальные клетки. Внутри бактериальной клетки молекулярной мишенью является пенициллин-связывающие белки. Отличаются еще более широким спектром микробиологической активности в отличие от представителей предыдущих поколений, включая MRSA.

*Цефтаролин* антибиотик цефалоспоринового ряда V поколения, анти-MRSA-цефепемы. Показания: внебольничная пневмония, вызванная чувствительными изолятами следующих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: *S. pneumoniae* (включая случаи, сопровождающиеся бактериемией), *S. aureus* (только метициллин-чувствительные изоляты), *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* и *E. coli*; осложненные инфекции кожи и мягких тканей, вызванные чувствительными изолятами следующих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: *S. aureus* (включая метициллин-чувствительные и метициллин-резистентные изоляты), *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* и *M. morganii*.

*Форма выпуска:* порошок для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий от желтовато-белого до светло-желтого цвета 600 мг. Вводится внутривенно в виде инфузий в течение 60 минут. Показан при осложненных инфекциях кожи и мягких тканей: 600 мг / 12 ч. 60 минут 5-14 дней. Внебольничная пневмония: 600 мг / 12 ч. 60 минут 5-7 дней. У пациентов с тяжелой почечной недостаточностью (КК <30) или терминальной стадией почечной недостаточности применение препарата противопоказано.

*Цефтобипрол* – активное вещество цефтобипрола медокарил. Является водорастворимым пролекарством цефтобипрола, цефалоспорины, обладающего бактерицидной активностью в отношении широкого спектра

грамположительных бактерий, включая MRSA, резистентные к пенициллину *S. pneumoniae*, а также чувствительные к ампициллину *E. faecalis*. Активен также в отношении многих грамотрицательных бактерий, включая многие изоляты семейства *Enterobacter spp.* и *P.aeruginosa*. Прочно связывается со многими важными пенициллин-связывающими белками (РВР) как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Обладает ярко выраженной бактерицидной активностью в отношении *Staphylococcus spp.*, резистентных к метициллину, благодаря прочному связыванию с РВР2а стафилококков, включая MRSA.

**Форма выпуска:** лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 500 мг. Флакон из прозрачного стекла, вместимостью 20 мл. Применяется при инфекциях, которые вызваны грамотрицательными бактериями, грамположительными и грамотрицательными бактериями при инфицированной диабетической стопе без сопутствующего остеомиелита, рекомендуемая доза препарата составляет 500 мг / 8 ч. в виде 120-минутных внутривенных инфузий. При инфекциях, которые вызваны грамположительными бактериями, 500 мг / 12 ч в виде 60-минутных внутривенных инфузий.

### 5.3 Группа монобактамов

Класс антибиотиков, полученный из *Pseudomonas acidophila* и *Chromobacterium violaceum*. В основе структуры лежит простое  $\beta$ -лактамное кольцо, лишенное тиазолидинового цикла.

**Механизм действия.** Нарушает синтез микробной стенки во время митоза клетки (обладает высокой аффинностью к ПСБ-3).

**Спектр действия** узкий, эффект бактерицидный. Активен против грам(–) бактерий (кишечная палочка, клебсиеллы, серрация, *H. influenzae*, протей, морганеллы, сальмонеллы, шигеллы, цитробактер, провиденция, синегнойная палочка и др.) и кокков (гонококк, менингококк). Мало активен против стафилококков, стрептококков, пневмококков, бактероидов, ацинетобактера. Устойчивы к действию  $\beta$ -лактамаз, продуцируемых грам(–) флорой, но разрушаются  $\beta$ -лактамазой, вырабатываемой стафилококками и бактероидами. Элиминация почками в неизменном виде, связывание с белками плазмы –60%.

**Азтреонам** (азактам)  $T_{1/2}$ –1,5 ч. **Форма выпуска** – флаконы по 0,5; 1 и 2 г препарата на 15 мл и бутылках на 100 мл. Вводится внутривенно, внутримышечно 1–2 г/ 6–8 ч.; ССД – 3–6 г, МСД – 8 г. Эффективен при инфекциях, вызванных устойчивыми к другим лактамным антибиотикам грам(–) микроорганизмами (госпитальными изолятами). Является альтернативой аминогликозидным антибиотикам вследствие меньшей токсичности. Показан при грам(–) сепсисе, менингите, инфекциях нижних дыхательных и мочевыводящих путей, кожи, мягких тканей, костей и суставов; интраабдоминальных и тазовых инфекциях (в комбинации с антианаэробными препаратами).

## 5.4 Группа карбапенемов

Класс  $\beta$ -лактамовых антибиотиков отличается от пенициллинов тем, что в молекуле соединений атом серы в тиазолидиновом цикле заменен на атом углерода.

**Механизм действия.** Нарушают, как и другие  $\beta$ -лактамы, синтез микробной стенки в момент митоза, но значительно лучше и быстрее проникают в микробную клетку за счет использования F-поринных трансмембранных и специальных D<sub>2</sub>-белков. Обладают высоким сродством к ПСБ, включая ПСБ-2 (синтезируют энтерококки, пневмококки и другие микроорганизмы устойчивые к антибиотикам). Подавляют выработку и освобождение эндотоксинов грам(–) микроорганизмов. Обладают выраженным постантибиотическим эффектом, длящимся 7–10 часов, как против грам(–), так и грам(+) микроорганизмов.

**Спектр действия.** Действуют бактерицидно; самые ультра широкие среди известных антибиотиков; более устойчивы к действию микробных  $\beta$ -лактамаз. Природной резистентностью обладают хламидии, микоплазмы, коринебактерии, микобактерии, флавобактерии, листерии, пастереллы, *E. faecium*, *P. aeruginosa*, *X. maltophilia*, MRSA, грибы.

Экскреция препаратов осуществляется главным образом в неизменном виде почками за счет клубочковой фильтрации и канальцевой секреции.

**Имипенем–циластатин** (тиенам, примаксин) T<sub>1/2</sub>–1 ч. –  $\beta$ -лактамовый препарат, состоит из двух компонентов: тиенамицинового антибиотика (карбапенема) и циластатина (1:1). Циластатин – специфический фермент (ингибитор дегидропептидазы I), тормозит метаболизм имипенема в почках и значительно повышает его концентрацию в мочевыводящих путях. Очень широкий спектр антибактериальной активности. Эффективен в отношении грам(–) флоры, включая псевдомонады (возможно быстрое развитие устойчивости), грам(+) флоры (все стафилококки, стрептококки, энтерококки, кроме *E. faecium*, пневмококки), а также в отношении анаэробной флоры (спорообразующие, кроме *C. difficile*, и неспорообразующие, включая *B. fragilis*). Активен в отношении *Nocardia asteroides*, *Mycobacterium fortuitum* и *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. Стабилен к действию  $\beta$ -лактамаз, вырабатываемых грам(+) и грам(–) бактериями.

**Форма выпуска** – флаконы по 0,25; 0,5 для внутривенного введения. Вводят по 0,5–1 г/ 6 ч. капельно за 30 мин. на 100 мл 5% раствора глюкозы или 0,9% NaCl. МСД – 4 г. При внутримышечном введении (форма выпуска 0,5; 0,75) вводят с интервалом 12 часов (препарат для внутримышечного введения не пригоден для внутривенного). Препарат в приготовленном виде хранить при +4°C не более 24 ч. Применяется при тяжелой грам(+) и грам(–) инфекции, вызванной множественно резистентными и внутригоспитальными изолятами бактерий: сепсис, перитонит,

внутригоспитальные пневмонии, особенно эффективен при наличии полимикробной флоры. Показания для внутримышечного введения – нетяжелые инфекции легких и брюшной полости, кожные язвы, эндометрит, при сепсисе и эндокардите препарат вводят внутривенно. У пожилых людей при почечной недостаточности, цереброваскулярных заболеваниях, судорожных припадках дозу уменьшают. Беременным дозы обычно увеличивают, так как максимальный уровень в сыворотке снижается, а клиренс повышается.

*Меропенем* (меронем, меррем)  $T_{1/2}$  – 1 ч. – антибиотик для парентерального применения, устойчив к дегидропептидазе–1 человека. Включает в спектр своей активности большинство клинически значимых грам(–) и грам(+) аэробных и анаэробных микроорганизмов. Высоко устойчив к большинству  $\beta$ -лактамаз. *Flavobacterium odoratum*, *E. faecium*, *P. aeruginosa*, *X. maltophilia* часто резистентны к карбапенемам. Выпускается во флаконах 0,5 и 1 г для внутривенного введения и разводится водой для инъекций. Вводится в виде внутривенной болюсной инъекции в течение 5 мин. или в виде внутривенной инфузии в течение 15–30 мин.

Назначают 0,5 г / 8 ч. – при лечении пневмоний, осложненных инфекций мочеполового тракта, инфекций кожи и мягких тканей; 1 г / 8 ч. – при лечении госпитальных пневмоний, перитонита, сепсиса, инфекций у пациентов с нейтропенией; 2 г / 8 ч. – при лечении менингита. ССД – 3 г. МСД – 6 г. Препарат выбора при неотложных для жизни состояниях (монотерапия). Не рекомендуется для лечения инфекции, вызванной *MRSA*. При проведении терапии, вызванной *P. aeruginosa*, рекомендуется регулярное определение чувствительности возбудителя.

## 5.5 Группа аминогликозидов

Содержат в молекуле аминсахара, соединенные гликозидной связью.

*Механизм действия.* Обладают бактерицидными свойствами, действуют внутри клетки микроорганизмов, связываясь с рибосомами (30 субъединицей), нарушают в пептидных цепях аминокислотную последовательность. Транспорт через цитоплазматическую мембрану зависит от наличия белков–переносчиков и уровня мембранного потенциала клетки. Аминогликозиды нарушают проницаемость цитоплазматической мембраны (процесс энергозависимый, что обуславливает неспособность аминогликозидов оказывать эффект в отношении анаэробных микроорганизмов). Особенности фармакокинетики аминогликозидов являются то, что они не всасываются в ЖКТ, плохо проникают через тканевые барьеры (ГЭБ, бронхиальный секрет, желчь), не метаболизируются в печени, выводятся с мочой в неизмененном виде.

*Спектр действия* широкий. Высоко активны по отношению к большинству грам(–) бактерий, но менее эффективны в отношении

гемофильной палочки, стрептококков, пневмококков, энтерококков, что обусловлено способностью микроорганизмов вырабатывать специфические ферменты, которые инактивируют аминогликозиды. Грам(–) кокки (гонококк, менингококк) – умеренно чувствительны, а анаэробы не чувствительны. Флора, резистентная к аминогликозидам 1-го поколения, часто чувствительна к гентамицину и аминогликозидам 3-го поколения.

*Показания к назначению:*

- тяжело протекающие инфекции (внутрибольничные, вызванные грам(–) бактериями; пневмонии и т.п.);
- осложненные внутрибрюшинные инфекции;
- остеомиелиты, менингиты (вводят эндолумбально или даже интравентрикулярно) и септицемия;
- синегнойная инфекция (аминогликозиды 2–3-го поколения);
- стафилококковая инфекция (аминогликозиды + цефалоспорины 1-го поколения или антистафилококковый пенициллин);
- энтерококковая инфекция (аминогликозиды + ампициллин);
- туберкулез (стрептомицин, канамицин); чума, туляремия, бруцеллез;
- инфекции мочевыводящих путей (мочу подщелачивать);
- осложненные инфекции респираторного тракта (возможно комбинирование внутримышечного или внутривенного введения с введением препарата в виде аэрозоля или путем ингаляции в просвет бронхов с частотой 4–6 раз в сутки).

В тяжелых случаях аминогликозиды комбинируют с антипсевдомонадными пенициллинами или цефалоспоридами.

Относительные показания для назначения аминогликозидов: санация кишечника при подготовке к операции на брюшной полости и для лечения кишечных инфекций; инфекционные заболевания с поражениями печени; пациенты с аллергическими реакциями на  $\beta$ -лактамы.

#### *5.5.1 Первое поколение аминогликозидов*

*Спектр действия* описан выше для аминогликозидов. В отличие от других аминогликозидов не действуют на синегнойную палочку.

*Стрептомицин*  $T_{1/2}$  – 2,3 ч. *Форма выпуска* – флаконы по 0,25, 0,5 и 1 г. Вводится внутримышечно 7,5 мг/кг / 12 ч. ССД – 1 г. МСД – 2 г. Используется преимущественно при лечении туберкулеза в комбинации с пенициллином, бруцеллеза, туляремии, чумы в комбинации с тетрациклинами, а также при септическом эндокардите, вызванном зеленым стрептококком или энтерококком.

*Механизм действия* – ингибирует инициацию, элонгацию и терминацию синтеза белка, вызывает ошибки считывания, связывается с малой субъединицей рибосомы, предотвращая взаимодействие т-РНК с 30S субъединицей. Устойчивость микрофлоры развивается быстро.

*Канамицин* (кантрекс)  $T_{1/2}$  – 2–2,5 ч. *Форма выпуска* – таблетки по 0,125 и 0,25 г и во флаконах для внутримышечного введения по 0,5 и 1 г. Используется преимущественно при туберкулезе, а также при системных инфекциях различной локализации. Вводится внутримышечно 7,5 мг/кг / 12 ч.; ССД – 1–1,5 г, МСД – 2 г. Чувствительны микобактерии туберкулеза.

*Неомицин* (колимицин, мицирин). *Форма выпуска* – таблетки по 0,1 и 0,25 г и флаконы по 0,5 г, мазь 0,5% и 2%. Активно подавляет кишечную бактериальную флору при печеночной недостаточности, высоко токсичен и чаще используется *per os* по 1 г 3 раза в день (в комбинации с эритромицином) для селективной деконтаминации ЖКТ перед операциями на толстом кишечнике или местно. Внутримышечно по 0,25 г 3 раза в сутки (парентеральное введение считается очень опасным). При печеночной коме 4–12 г в день *per os*. Для детей препарат не применяют.

### 5.5.2 Второе поколение аминогликозидов

*Спектр действия* – действуют на синегнойную палочку. Активны в отношении аэробных грам(–) бактерий, кишечной палочки, энтеробактерий, пневмококков, протей, синегнойной палочки, франциселлы; действуют на изоляты микроорганизмов, выработавших устойчивость к аминогликозидам 1-го поколения. Слабо активны в отношении стрептококков, энтерококков и не активны при анаэробной инфекции.

*Гентамицин*.  $T_{1/2}$  – 1,7–2,3 ч. *Форма выпуска* – ампулы по 1 и 2 мл 4% раствора, ампулы по 1 и 2 мл (40 и 80 мг препарата, соответственно), флаконы по 0,04 г, 0,1% мазь. Применяется внутримышечно, в тяжелых случаях внутривенно 0,04–0,08 / 8 ч.; ССД – 2,4–5,1 мг/кг; МСД – 8 мг/кг. Показан при бактериальных инфекциях дыхательных путей, мочеполовой системы, кожи, мягких тканей, сепсисе и др. При лечении септицемии препарат комбинируют с одним из  $\beta$ -лактамных антибиотиков или противоанаэробных препаратов (метронидазол, клиндамицин).

*Тобрамицин* (бруламицин, обрацин)  $T_{1/2}$  – 2–2,5 ч. *Форма выпуска* – ампулы по 2 мл в виде готового 4% раствора (80 мг препарата) и флаконы по 40, 50, 75 и 80 мг. Применяется внутривенно, внутримышечно 2 мг/кг/ 8 часов в дозе 0,04–0,08 г 3 раза в день; ССД – 5 мг/кг, МСД – 6 мг/кг. Назначают при сепсисе, пневмонии, гнойном отите, эмпиеме, плеврите, инфекции мочевых путей курсом 7–10 дней.

*Нетилмицин* (нетромицин, небрин)  $T_{1/2}$  – 1,5–2,7 ч. – полусинтетический препарат, менее ото- и нефротоксичен. Выпускается – водный раствор в ампулах (флаконы) для внутривенного и внутримышечного применения по 200, 150 и 50 мг/мл (содержат 0,2 или 0,5 г). Рекомендуются 4–6 мг/кг/день / 8 или 12 или 24 ч. МСД – 7,5 мг/кг. Продолжительность лечения 7–10 дней. Рекомендуются комбинации с пенициллином против энтерококков, карбенициллином или тикарциллином против псевдомонад, а также другими  $\beta$ -лактамными антибиотиками (цефуроксим, цефотаксим, цефотаксим, амоксициллин).

При концентрации в плазме 4 мг/мл активен против широкого спектра бактерий: *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *H. influenzae*, *Serratia spp.*, *Neisseria spp.*, стафилококков, включая  $\beta$ -лактамазопродуцирующие и MRSA изоляты. Только часть изолятов *Acinetobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Aeromonas spp.* чувствительны, а энтерококки, пневмококки и анаэробы имеют низкую чувствительность.

### 5.5.3 Третье поколение аминогликозидов

**Амикацин** (амикин) – производное канамицина А;  $T_{1/2}$ –2–3ч. **Форма выпуска** – ампулы по 2 мл по 100 или 500 мг препарата и флаконы по 100, 250 и 500 мг в 2 мл, вводится внутривенно, внутримышечно – 7,5 мг/кг/ 8–12 ч. ССД – 15 мг/кг, МСД — 25 мг/кг (не более 15 г на курс лечения). Изоляты, устойчивые к амикацину, устойчивы ко всем другим аминогликозидам. Эффективен в большей степени при инфекциях, вызванных грам(–) бактериями, включая синегнойную палочку (эндокардит, перитонит, инфекции брюшной полости, остеомиелит, сепсис, инфицированные ожоги, инфекции ЦНС, опорно–двигательной системы, ЖКТ, инфекционные заболевания кожи, мягких тканей и инфекционно–воспалительные заболевания органов дыхания). Видимо, самый активный препарат из аминогликозидов, особенно при хирургической госпитальной инфекции.

## 5.6 Группа тетрациклинов

По происхождению подразделяются на *природные и полусинтетические* (в основе химического строения – конденсированная четырехциклическая система).

**Механизм действия.** Бактериостатики широкого спектра действия и влияют на синтез белка, связываясь с S7 белком 30S субъединицы рибосомы и прекращая доступ комплексов, состоящих из т–РНК с аминокислотами, к комплексам информационных РНК с рибосомами.

**Спектр действия** очень широкий. Активны почти при всех инфекциях, вызванных грам(–) и грам(+) бактериями, простейшими (*Plasmodium falciparum*) за исключением большинства изолятов энтерококков, микобактерий, индол(+) протея, серраций, цитробактера, кишечной палочки, сальмонелл, шигелл, клебсиелл, коринебактерий, ацинетобактера, энтеробактера, синегнойной палочки, ксантомонас, *S. difficile*, бактериоидов, гемофильной палочки, простейших и грибов. Доксициклин активен против *Helicobacter pylori*. Если при лечении развивается устойчивость микрофлоры, то она носит полный перекрестный характер (за исключением миноциклина), поэтому все тетрациклины назначают по единым показаниям.

Препараты не проникают в бактериальные клетки, содержащие R–плазмиды. В средних терапевтических концентрациях обнаруживаются в

легких, печени, почках, селезенке, матке, миндалинах, предстательной железе, накапливаются в воспаленной и опухолевой тканях. В комплексе с кальцием откладываются в костной ткани, эмали зубов.

Тетрациклины рекомендуется применять при многих инфекциях, особенно смешанных, или в случаях, когда лечение начинают без идентификации возбудителя.

*Показания:*

- особенно эффективны при микоплазменных (микоплазменная пневмония) и хламидиозных инфекциях;
- при кишечных инфекциях (иерсиниоз – доксициклин);
- урогенитальной инфекции (мочу надо подкислять), включая гонококк;
- сифилисе, риккетсиозах, боррелиозе;
- инфекции желчевыводящих путей;
- особо опасных (холера, чума, сибирская язва) и зоонозных (лептоспироз, бруцеллез, туляремия) инфекциях;
- инфекции кожи и мягких тканей (препарат миноциклин), а также остеомиелите.

Принимать *per os* натощак или через 3 часа после еды и запивать 200 мл воды.

#### *5.6.1 Природные тетрациклины*

*Тетрациклин*  $T_{1/2}$  – 6–10 ч. Хорошо всасывается в ЖКТ. *Форма выпуска* – таблетки по 0,05; 0,1 и 3% мазь. Назначается 0,25–0,5 г / 6 ч. или 0,5–1 г / 12 ч. ССД – 1–2 г, МСД – 2 г. Внутримышечно вводится по 0,1 г 3 раза в сутки. Тетрациклина гидрохлорид выпускают во флаконах по 0,1 г для внутримышечных инъекций, разводят в 2,5–5 мл 1–2% р-ра новокаина. Мазь глазная содержит 0,01 г препарата в 1 г мази и выпускается в тубах по 3, 7, 10 г; применяется при лечении трахомы, конъюнктивитов, блефаритов и другие заболеваний глаз.

#### *5.6.2 Полусинтетические тетрациклины*

*Доксициклин* (вибрамицин)  $T_{1/2}$ –15–24 ч., хорошо всасывается в ЖКТ и практически полностью выделяется через ЖКТ. Хорошо проникает в бронхиальный секрет, придаточные пазухи носа, желчь, предстательную железу и плохо через ГЭБ.

*Форма выпуска* – капсулы по 0,05 и 0,1 г; ампулы или флаконы для внутривенных инъекций по 0,1 г и сироп 0,01 г в 1 мл во флаконы 20 мл. *Per os* применяется по 0,1 г 2 раза в сутки, в последующие дни – 0,1 г в сутки, в тяжелых случаях СД – 0,2 г. Для внутривенных инъекций 0,1 г растворяют в 100–300 мл изотонического раствора NaCl и вводят внутривенно капельно в течение 30–60 мин. 2 раза в день.

Показан при остром и хроническом бронхите, пневмонии, плеврите, инфекции мочеполовой системы. Курс лечения 7–10 дней. *Эффективен для*



лечения и профилактики малярии, лептоспироза, брюшного тифа.

Миноциклин (клиндомицин, миноцин)  $T_{1/2}$ –12–16 ч. – применяется *per os* / 12 ч. В первый день ССД – 0,2 г, в последующие дни – 0,1 г, МСД до 0,4 г. Более эффективен для лечения стафилококковых и профилактики менингококковых инфекций, чем другие тетрациклины. Активен в отношении изолятов *Propionobacterium acnes*, устойчивых к другим тетрациклинам. Активен в отношении *N. asteroides*, *Mycobacterium marinum*.

### 5.6.3 Глицилциклины

Тигециклин (международное наименование тигацил)  $T_{1/2}$  – 42 ч. Класс глицилциклинов, имеют структурное сходство с антибиотиками класса тетрациклинов. Ингибирует трансляцию белка у бактерий за счет связывания с 30S-субъединицей рибосом, блокирует молекулы аминокил-тРНК. Тигециклин может преодолевать два основных механизма резистентности микроорганизмов, наблюдаемых в отношении тетрациклинов: рибосомальную защиту и активное выведение.

Форма выпуска – лиофилизат для приготовления раствора для инфузий в виде порошка или пористой массы оранжевого цвета во флаконах по 50 мг. Вводят в/в капельно в течение 30-60 мин. Начальная доза для взрослых составляет 100 мг, далее по 50 мг через каждые 12 ч.

Используется преимущественно в качестве монотерапии тяжелых инфекций. Установлена эффективность тигециклина для лечения интраабдоминальных инфекций, вызванных анаэробными бактериями. *P. aeruginosa* обладает устойчивостью к препарату. К препарату чувствительны грамположительные аэробные микроорганизмы: энтерококки, *S. aureus*, включая MRSA, стрептококки; грамотрицательные аэробные микроорганизмы: *K. pneumoniae* (включая изоляты, продуцирующие  $\beta$ -лактамазу широкого спектра), *L. pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *S. marcescens*, *Bacteroides fragilis* group 1, 2, *Clostridium perfringens*, *Peptostreptococcus* spp., *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella* spp.; атипичные микроорганизмы: *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*. Виды, у которых возможно развитие приобретенной устойчивости: *A. baumannii*, *B. cepacia*, *M. morganii*, *Providencia* spp., *Proteus* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*.

## 5.7 Группа макролидов –

содержат в молекуле макроциклическое лактонное кольцо, связанное с углеводными остатками.

Механизм действия. Бактериостатики, но в зависимости от вида возбудителя и концентрации могут проявлять бактерицидный эффект. Механизм действия: связываются с 50S субъединицы рибосомы и предотвращают доступ комплекса транспортной РНК с аминокислотой к комплексу информационной РНК с рибосомами, что приводит к

подавлению синтеза белков.

*Спектр действия.* Высококочувствительны грам(+) кокки (пневмококк, пиогенный стрептококк), микоплазма, легионелла, хламидии, коклюшная палочка, дифтерийная палочка. Умеренно чувствительны к макролидам гемофильная палочка, стафилококк, резистентны – бактериоиды, энтеробактерии, риккетсии. Активность макролидов против бактерий связана со структурой антибиотиков. Различают макролиды 14–членные (эритромицин, олеандомицин, флюритромицин, кларитромцин, мегаломицин, диритромицин), 15–членные (азитромицин, рокситрамицин), 16–членные (спирамицин, йозамицин, розамицин, туримицин, миокамецин). 14–членные макролиды обладают более высокой бактерицидной активностью, чем 15–членные, в отношении стрептококков и коклюшной палочки. Высокоэффективны при респираторной инфекции и пневмонии. Мало токсичны, отсутствует перекрестная реакция с  $\beta$ -лактамами.

#### 5.7.1 Первое поколение (старые макролиды)

*Эритромицин* (продуцент *Streptomyces erythreus*) в щелочной среде превращается в антибиотик широкого спектра действия, активно подавляющий высокоустойчивые грам(+) кокки (стафилококки, включая *PRSA*, пневмококки, стрептококки, исключая энтерококки) и грам(–) кокки (гонококки, менингококки, *M. catarrhalis*), грам(–) бактерии, в частности, синегнойную палочку, эшерихии, протей, клебсиеллы, легионеллы, кампилобактерии, *B. pertussis*, умеренно активен против гемофильной палочки. Препарат также активен против спирохет, хламидий, микоплазм.

*Форма выпуска* – в таблетках по 0,1 и 0,25 г, капсулах по 0,1 и 0,2 г, флаконы для внутримышечного и внутривенного введения по 0,05, 0,1 и 0,2 г. Назначается *per os*, внутривенно, внутримышечно. *Per os* применяется / 4–6 часов, ССД – 1 г, МСД – 2 г. Внутримышечно и внутривенно применяется / 8–12 ч.; ССД – 0,6 г, МСД – 1 г. Рекомендуются при инфекциях мочевых, желчных путей и местной хирургической инфекции, микоплазменной и легионеллезной пневмонии, хламидийной инфекции, при аллергии к пенициллину.

Мазь эритромициновая – *форма выпуска* – в тубах 3, 7, 10, 15 и 30 г. Применяют при лечении гнойничковых заболеваний кожи, инфицированных ран, пролежней, ожогов II и III степени, трофических язв. Эритромицин и эритромицин–стеарат следует принимать до еды

*Олеандомицин* продуцент *Streptomyces antibioticus*. По спектру активности близок к эритромицину, но менее активен. Устаревший препарат, выпускается в таблетках по 0,125 и 0,25 г.

*Олететрин* (тетраолеан) – сочетание олеандомицина и тетрациклина в соотношении 1:2. Выпускается в таблетках и капсулах по 0,125 и 0,25; флаконы по 0,1; 0,25 и 0,5. Назначается по 0,25–0,5 г 4 раза в день *per os* за 1–1,5 часа до еды; внутримышечно 0,1 г 2–3 раза в день; внутривенно 0,5 г 2–4 раза в день.

### 5.7.2 Второе поколение или «новые» макролиды

Особенности – более широкий спектр антибактериального действия, стабильность в кислой среде.

**Азитромицин** (сумамед, зитромакс)  $T_{1/2}$  – 68 ч. Выделяют в новый класс азалидных АБ (3-е поколение макролидов), близкий к макролидам. Бактерицидный антибиотик в высокой концентрации, обладает широким спектром активности. Высокоэффективен в отношении грам(+) микробов (стрептококков, стафилококков, в том числе продуцирующих  $\beta$ -лактамазы), умеренно активен в отношении энтерококков, а также грам(–) возбудителей (гемофильной, коклюшной, кишечной палочек, шигелл, сальмонелл, иерсиниоза, легионелл, хеликобактера, хламидий, микоплазм), возбудителя гонореи, спирохет, многих анаэробов, токсоплазм. Выделяется преимущественно с желчью, в меньшей степени – с мочой.

**Форма выпуска** – флаконы 0,5 г; таблетки по 125 и 500 мг; капсулы по 250 мг и сироп «форте» 200 мг/мл или сироп 100 мг/5мл. Назначается внутривенно 0,5 г в день; *per os* за 1 час или через 2 часа после еды, быстро всасывается в ЖКТ (стабилен в кислой среде желудка), обычно в 1-й день принимают однократно 500 мг со 2-х по 5-е сутки – 250 мг 1 раз в сутки. Курс лечения – 5 дней. Препарат выбора при негоспитальной пневмонии; лечение сокращается до 3–5 дней. При лечении острых урогенитальных инфекций достаточно однократного приема 500 – 1000 мг. Болезнь Лайма – курс 5 дней в общей дозе 3 г. Показан при хламидийных инфекциях и гонорее (1,0 однократно), скарлатине, инфекции кожи и мягких тканей.

**Мидекамицин** (макропен) показан при пневмонии, бронхите, инфекции кожи и подкожной клетчатки, фарингите, ангинах, вызванных *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella spp.*, гастроэнтерит, вызванный *Campylobacter spp.*, коклюш, дифтерия зева, скарлатина.

**Форма выпуска** – таблетки, покрытые оболочкой, 400 мг; порошок для приготовления суспензии для приема внутрь 175 мг/5 мл во флаконах 115 мл. МСД 1600 мг.

Применяется *per os* дети до 12 лет: 30–50 мг/кг/сут. в 2 приема; старше 12 лет: 400 мг 3 раза в сутки, максимальная доза 1,6 г/сут.

**Иозамицин** (джозамицин, вильпрафен). **Форма выпуска** – таблетки по 0,05 г; 0,15 г; 0,2 г; 0,25 г; 0,5 г. Назначается по 0,2 г 3 раза в день, курс 7–10 дней.

**Рокситромицин** (рулид) – бактериостатик, антимикробный спектр близок к спектру азитромицина, но в отношении хеликобактерий действие снижено. Высокоактивен против уреаплазм, хламидий, гарднерелл. Резистентны – синегнойная, кишечная палочка, шигеллы, сальмонеллы. **Форма выпуска** – таблетки по 150 и 300 мг. Назначается *per os* по 150 мг 2 раза в сутки, при тяжелом течении возможно увеличение дозы в 2 раза. Показан при инфекциях верхних и нижних дыхательных путей, мочеполового тракта и заболеваниях передаваемых половым путем, инфекциях кожи и мышечных тканей. Курс лечения – 7–10 дней.

*Спирамицин* (ровамицин)  $T_{1/2}$  – 8 ч. *Форма выпуска* – таблетки по 1,5 млн. МЕ и 3 млн. МЕ, а также в суппозиториях, содержащих по 1,3 млн МЕ (500 мг) и 1,9 млн МЕ (750 мг) препарата; флаконы 1,5 млн МЕ лиофилизированного порошка для инъекций. Назначается *per os* по 3–6 млн. МЕ или 150 тыс. МЕ/кг в сутки 2–3 раза в день для лечения неосложненных пневмоний (начинают внутривенно, затем переходят на *per os*). Применяется в оториноларингологии, бронхопульмонологии, стоматологии, гинекологии, при инфекциях мягких тканей, для лечения простатита, токсоплазмоза, профилактики суставного ревматизма, менингококкового менингита.

*Мидекамицин, Иозамицин, Рокситромицин, Спирамицин* – обладают бактериостатическим эффектом. Спектры антимикробного действия близки к азитромицину. *Спирамицин* по сравнению с другими макролидами менее активен в отношении хламидий, достаточно эффективен при пневмококковой инфекции. Резистентны к спирамицину энтеробактерии, псевдомонады. Обладает иммуномодулирующей активностью за счет стимуляции фагоцитов.

*Кларитромицин* (клайд)  $T_{1/2}$  – 5–8,7 ч. Спектр антимикробного действия близок к спектру действия азитромицина и считается наиболее эффективным в отношении легионелл; обладает наибольшим эффектом против стрептококков, пневмококков, дифтерийной палочки. Препарат выбора при лечении хламидиозной инфекции и хеликобактериозов.

*Форма выпуска* – в таблетках по 0,25 г и 0,5 г; флаконах 0,5 г и порошке для приготовления суспензии для приема внутрь по 1,5 и 2,5 на 60 и 100 мл. Назначается по 0,25 г 2 раза в сутки, при тяжелом течении заболевания дозу следует увеличить до 0,5 г/12 ч. Курс 6–14 дней.

## 5.8 Группа левомицетина (хлорамфеникола)

*Механизм действия.* Угнетают синтез белка (связываются с 50S – субъединицей рибосомы), ингибируют образование (p)ppGpp при участии рибосом, дерепрессируя тем самым транскрипцию рРНК.

Бактериостатики широкого спектра действия, исключая пневмококки, менингококки и *H. influenzae*, на которые действуют бактерицидно. *Спектр действия.* Активны – грам(+), грам(–), аэробных и анаэробных бактерий, микоплазм, хламидий, риккетсий, не активны против синегнойной палочки, коринебактерий, цитробактера, энтеробактера, индол(+) протей, ацинетобактера, серраций, многих изолятов стафилококков, энтерококков, клостридий (включая *C. difficile*), микобактерий, простейших и грибов. Хорошо проникают через ГЭБ, высокие концентрации в мокроте, желчи, простате. Метаболизируется в печени.

*Хлорамфеникол* (левомицетин)  $T_{1/2}$  – 2,3 ч. – продуцент *Streptomyces venezuelae*; препарат резерва. Молекула антибиотика содержит нитробензен, опосредующий его токсичность для клеток млекопитающих. Выпускается в таблетках по 0,25 и 0,5 г, таблетках пролонгированного действия

по 0,65 г, капсулах по 0,25 г. Принимается *per os* 0,5–1,0 / 6 ч. ССД – 2 г, МСД – 6 г. Глазные капли во флаконах по 0,25% – 10 мл. Входит в состав мазей «Левомеколь», «Левосин».

*Левомецетина сукцинат* (хлороцид С) активируется в организме после отщепления остатка янтарной кислоты. Выпускается во флаконах по 0,5 и 1 г. Вводится внутривенно или внутримышечно / 8–12 ч. ССД – 1,5–2 г, МСД – 4 г (50 мг/кг/сутки). Внутримышечное введение не рационально – фармакокинетика непредсказуема. Парентерально назначать только при тяжелых инфекциях, вызванных чувствительными к нему микроорганизмами (бактериальный менингит, анаэробная инфекция, системный сальмонеллез, внутриглазные инфекции, риккетсиозы, иерсиниоз, дизентерия, бруцеллез, туляремия).

## 5.9 Группа линкозамидов

*Механизм действия.* Ингибируют синтез РНК на уровне 50S-субъединицы рибосом, в терапевтических дозах оказывают бактериостатическое действие. *Спектр действия.* Для всех препаратов этой группы характерно бактериостатическое действие, узкий спектр активности (грам(+)) кокки и анаэробы), способность накапливаться в костях и суставах, отсутствие перекрестной реакции с  $\beta$ -лактамами. Эффективны в отношении грам(+) бактерий, стафилококков, стрептококков, пневмококков, дифтерийной палочки и некоторых анаэробов, в том числе возбудителей газовой гангрены и столбняка. Активны в отношении стафилококков (в том числе вырабатывающих  $\beta$ -лактамазу), устойчивых к другим антибиотикам. Не действуют на грам(–) бактерии (все изоляты *E. coli* устойчивы), грибы, вирусы.

*Линкомицин* (линкоцин, нелорен)  $T_{1/2}$  – 5,5 ч., продуцируется *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis*. Выпускается в капсулах по 0,25 и 0,5 г, ампулах по 1 мл и 2 мл с 0,3 и 0,6 г вещества соответственно. Назначается *per os*, внутривенно, внутримышечно. *Per os* применяется 0,5 г/ 6–8 ч. за 1–1,5 часа до еды, ССД – 2 г, МСД – 3 г. Внутривенно и внутримышечно 0,6 г/ 8–12 часов, ССД – 1–1,2 г, МСД – 1,8 г.

*Клиндамицин* (далацин Ц)  $T_{1/2}$  – 2,5 ч., хлорированное производное линкомицина (7-хлор-7-дезоксилинкомицин). Обладает высокой антимикробной активностью: все стафилококки и стрептококки, все анаэробы (активнее чем линкомицин в отношении бактероидов), хламидии. В высоких дозах действует на хламидии и токсоплазмы. Устойчив к любым  $\beta$ -лактамазам. Максимально накапливается в костной ткани, поэтому является препаратом выбора при остеомиелите. Лучше всасывается в ЖКТ, создаются более высокие концентрации в крови.

*Форма выпуска* – детский сироп 75 мг/мл 80 мл; капсулы по 0,075, 0,15, 0,3 г и в ампулах с раствором, содержащим 0,15; 0,3 или 0,6 г. Применяется *per os*, внутривенно, внутримышечно. *Per os* 0,15–0,45 г/ 6 часов за 1–1,5 часа до еды, ССД – 0,6 г, МСД – 1,8 г. Внутримышечно вводится 0,6/ 6–12 ч. ССД

– 1,2–1,8 г, МСД – 2,7 г (разовая доза не выше 900 мг!). Внутривенно 2,4–2,7 г в день за 2–4 введения; МСД – 4,8 г.

*Линкозамиды показаны:* инфекции дыхательных путей, кожи и мягких тканей, костей, суставов, инфекции тазовых органов и внутрибрюшные инфекции, сепсис, эндокардит; при токсоплазмозе, малярии – препарат выбора. Профилактика перитонита и внутрибрюшных абсцессов после перфорации кишечника. Длительность терапии от 7–14 дней до 3 нед.

### 5.10 Группа анзамицинов (рифампицинов)

*Механизм действия.* Ингибируют транскрипцию в бактериях, за счет связывания  $\beta$ -субъединицы бактериальной РНК-полимеразы и ингибиции инициации цепи, если элонгация цепи еще не началась.

*Рифампицин* (рифадин, рифарен, римактан, бенемицин) – полусинтетический, бактерицидный препарат широкого спектра действия, активен в отношении микобактерий туберкулеза, лепры, а также грам(+) флоры, включая *PRSA* и *MRSA* изоляты стафилококков, гонококков, менингококков. Действует на большинство грам(–) бактерий (хламидии, микоплазмы; умерено чувствительны – анаэробы, энтеробактерии и гемофильная палочка). Метаболизируется в печени, выделяются с желчью и мочой. При лечении моча, слезы, мокрота приобретают оранжево-красный цвет.  $T_{1/2}$  – 2–5 ч. Выпускается – капсулы по 0,05, 0,15 и 0,3 г и ампулы 0,15 г для внутривенного введения. Применяется *per os* 2 раза в сутки; ССД – 0,6–0,9 г, МСД – 1,2 г.

*Показан:* туберкулез (в сочетании с изониазидом), инфекции кожи и мягких тканей, вызываемые стафилококками (включая *MRSA* изоляты, в сочетании с аминогликозидами 2-го и 3-го поколения, клиндамицином, фузидином или фторхинолоном) и другими грам(+) кокками; при пневмониях, бронхопневмониях, остеомиелите, пиелонефрите, пиелостите, холангите, холецистите и т.п.

### 5.11 Полимиксины

*Механизм действия.* Связываются с фосфолипидами цитоплазматической мембраны, нарушают ее структуру и осмотическую функцию. *Полимиксин В и Е* получены из *Bacillus polymyxa*. Действуют бактерицидно (спектр узкий) преимущественно на грам(–) флору (кишечную, дизентерийную, брюшнотифозную и гемофильную палочки, энтеробактер, паратифозную флору, иерсинии, псевдомонады), однако не влияют на протей, провиденсия, серрации, нейссерии, дифтерийную палочку, клостридии, бактероиды, грибы. Не всасываются в ЖКТ и при местном применении, не проникают через ГЭБ и другие тканевые барьеры. Быстро инактивируются в гное, метаболизируются в печени, выводятся почками.

*Полимиксин В* (аэроспорин, полмикс, бациллоспорин)  $T_{1/2}$  – 3,5–4 ч. *Форма выпуска* – флаконы по 25 и 50 мг (250 и 500 тыс. ЕД соответственно). Применяется как препарат резерва при сепсисе, менингите (вводится интралюмбально), пневмонии, кишечных инфекциях, инфекциях мочевых путей, вызванных псевдомонадами, а также в комбинации с бацитрацином или неомицином для лечения инфекций кожных покровов и слизистых, глаз, ушей. Плохо проникает в плевральную, перитонеальную и асцитическую жидкости, в связи с чем необходимо введение непосредственно в очаги инфекции. При инфекциях, вызванных другой грам(–) флорой, используют только в случае полирезистентности возбудителя к другим менее токсичным препаратам. Внутривенно вводится в 200 мл 5% раствора глюкозы со скоростью 60–80 капель в мин. 1,5–2,5 мг / 12 часов, ССД – 2 мг/кг, МСД – 150 мг. Внутримышечно вводится / 6–8 часов, ССД – 1,5–2,5 мг/кг, МСД – 200 мг. Курс лечения  $\leq 5$ –7 дней.

*Полимиксин Е* (колистин, колимицин)  $T_{1/2}$  – 3,5–4 ч. Выпускается – порошок во флаконах 1 млн МЕ. Во многом схож с полимиксином В. Вводится 3–4 раза в день внутримышечно, внутривенно, эндолюмбально, в полости, в виде аэрозоля в легкие. Выводится почками в неизмененном виде, активен только в кислой среде.

*Полимиксины опасно назначать детям до 12 лет и людям пожилого возраста!*

## **5.12 Бацитрацины –** пептидные антибиотики, продуцируемые *Bacillus subtilis* и *licheniformis* перед спорообразованием.

*Механизм действия.* Ингибируют дефосфоризацию пирофосфатов липидов и останавливает синтез клеточной стенки, а также нарушают функцию цитоплазматической мембраны. *Спектр действия.* Эффект бактерицидный. Особенно активны против стрептококков группы А, стрептококков (С и G мало чувствительны, В – резистентны) и *C. difficile*. На грам(–) бактерии не действуют за исключением нейссерий.

*Бацитрацин* получен из *B. licheniformis* и содержит в основном бацитрацин А. Часто используется для приготовления кремов, мазей, растворов и т.п. В хирургической практике используется при лечении инфицированных ран, а также с полимиксинами для лечения псевдомембранозного колита. Дозы для внутримышечного введения: 10 000–25 000 ед 4 раза в сутки, максимальная доза 100 000 ед/сут.

## **5.13 Гликопептиды**

*Механизм действия.* Действуют на делящиеся микроорганизмы, подавляя образование пептидогликанового компонента клеточной стенки (связываются с D–аланил–D–аланином) и ДНК.

**Спектр действия.** Обладают бактерицидным действием и узким спектром активности, применяются главным образом при инфекциях, вызванных *MRSA* и энтерококками.

**Ванкомицин** (ванкоцин)  $T_{1/2}$  – 4–6 ч.; гликопептид получен из грибка *Streptomyces orientalis*. Обладает бактерицидным действием в отношении грам(+) кокков (включая  $\beta$ -лактамазообразующие стафилококки, пневмококки, энтерококки), грам(+) палочек (коринобактерии, *Bacillus anthracis*), анаэробов (клостридии, включая *C. difficile*), актиномицет. Плохо всасывается в кишечнике, через ГЭБ проникает только при воспалении оболочек мозга, выводится в неизмененном виде почками.

**Форма выпуска** – порошок во флаконе 0,5 и 1,0 г; капсулы по 0,125 и 0,25 г. Применяется: при пневмониях и энтероколитах, вызванных клостридиями (псевдомембранозный колит) или реже стафилококками *per os*: при тяжелых инфекциях, вызванных *MRSA*, стрептококками; при тяжелых стафилококковых инфекциях у лиц с аллергией к пенициллинам и цефалоспорином; при стрептококковом эндокардите у пациентов с аллергией к пенициллину (ванкомицин + аминогликозид); у пациентов с грам(+) инфекцией при аллергии к  $\beta$ -лактамам; профилактике послеоперационных осложнений. Вводится внутривенно только капельно 0,5–1,0 г/ 6–12 часов в течение  $\geq 1$  часа в 100–200 мл 5% раствора глюкозы или 0,9% растворе NaCl, ССД – 30 мг/кг. МСД – 3 г. Внутримышечные инъекции сопровождаются болевыми ощущениями и обычно не применяются. *Per os* 0,5–2 г/сутки 3–4 раза в день. Возможно интрацекальное введение по 5–10 мг через 48–72 ч.

**Тейкопланин** (тейкомицин  $A_2$ ) – близок к ванкомицину; эффективен только против грам(+) бактерий. Наибольшую активность проявляет в отношении золотистого стафилококка (даже внутриклеточно), пневмококка, зеленышго стрептококка. Внутримышечно по 200 мг или 3–6 мг/кг массы тела 1 раз в сутки. При инфекционном артрите поддерживающая доза 12 мг/кг/сутки, при эндокардите, вызванном *S. aureus*, насыщающая доза 12 мг/кг / 12 часов x 3 суток, поддерживающая – 12 мг/кг 1 раз/сутки.

## 5.14 Хинолоны –

антибактериальные препараты широкого спектра действия.

**Механизм активности** опосредован ингибированием топоизомеразы (ДНК–гиразы), что препятствует спирализации молекулы ДНК.

### 5.14.1 Первое поколение (производные 8-оксихинолина)

**Нитроксалин** (5-НОК) – широкий спектр действия. **Механизм действия** – селективно ингибирует синтез бактериальной ДНК. Активен против грам(+) и грам(–) микроорганизмов (включая внутриклеточные формы), в том числе *P. aeruginosa*, кандиды. Хорошо всасывается в ЖКТ и создаёт высокую концентрацию в моче.

**Форма выпуска** – таблетки по 50 мг. Назначают 100–200 мг 3–4 раза



в день, ССД – 600–800 мг; МСД – 1,2 г. Показания: инфекции мочеполовых путей; профилактика инфекций при диагностических и/или лечебных манипуляциях на почках и мочевых путях; послеоперационные инфекции при хирургических вмешательствах на почках и мочевых путях.

*Налидиксовая кислота* (невиграмон, неграм)  $T_{1/2}$  – 1–1,5 ч, производное нафтиридина. *Механизм действия* – ингибирует субъединицу А бактериальной ДНК-гиразы. *Спектр активности* включает грам(–) бактерии, исключая синегнойную палочку. Хорошо всасывается в ЖКТ, особенно натощак. Высокие концентрации создаются только в моче (при ощелачивании мочи антимикробный эффект препарата повышается).

*Форма выпуска* – таблетки по 0,5 г. Назначают *per os* по 0,5 г 4 раза в день после еды. МСД – 4 г. Показан при инфекциях мочевыводящей системы, преимущественно цистите, противорецидивная терапия хронического пиелонефрита (так как в ткани почек создается низкая концентрация препарата, не рекомендуется применять при остром пиелонефрите), кишечных инфекциях.

#### 5.14.2 Второе поколение – фторхинолоны

*Механизм действия.* Угнетают бактериальную топоизомеразу 2-го типа (ДНК-гиразы), что приводит к нарушению генетической рекомбинации, репарации и репликации ДНК, а при использовании больших доз препаратов – торможение транскрипции ДНК и приводит к быстрой гибели бактерий. Второй механизм – повреждение мембраны бактериальной клетки, что приводит к выходу клеточного содержимого. Все фторхинолоны хорошо проникают в ткани и клетки.

*Спектр активности.* Широкого спектра действия, бактерицидный эффект, эффективны в отношении грам(+) и грам(–) бактерий (эффект большой). Резистентность к фторхинолонам развивается редко.

Занимают одно из ведущих мест в лечении бактериальных инфекций: инфекционно-воспалительных процессов в бронхопульмональной и мочевыводящей системах в связи со способностью хорошо проникать в эти ткани. Различают монофторированные соединения (ципрофлоксацин, офлоксацин, эноксацин, пефлоксацин, амифлоксацин, руфлоксацин), которое широко применяются в клинической практике, ди- (дифлоксацин, амефлоксацин) и трифторированные соединения (флероксацин, темафлоксацин).

*Ципрофлоксацин* (ципробай, ципроксин, ципринол, ципроцинал, квинтор, ципролет, цифлоцин, цифран)  $T_{1/2}$  – 4 ч. Активен в отношении грам(+) и грам(–) бактерий, включая *P. aeruginosa*, энтеробактерии, *S. aureus*. Малочувствительны стрептококки, резистентны: анаэробы (большинство бактероидов, клостридий и фузобактерий, актиномицеты). Хорошо проникает в различные органы и ткани, клетки (в мокроту – 100%; в плевральную жидкость – 85%; ткань легкого – 200–1000%).

*Форма выпуска* – таблетки по 0,25, 0,5 и 0,75 г, флаконы по 50 мл

инфузионного раствора (100 мг препарата); флаконы по 100 мл инфузионного раствора (200 мг препарата) и флаконы 50 мл (100 мг препарата); ампулы 10 мл концентрированного инфузионного раствора (100 мг препарата).

Применяется *per os* 0,5–0,75 г 2 раза в день (при остром гонорейном уретрите – 0,5 г однократно) и внутривенно 0,2–0,4 г 2 раза в сутки. Внутривенно можно вводить медленно струйно или капельно. ССД при приеме *per os* – 1,5 г, при внутривенном введении – 0,4–0,8 г. Инфекции дыхательных путей 250–500 мг 2 раза в сутки *per os* или внутривенно 200 мг/12 ч. При тяжелой инфекции можно повысить *per os* до 0,5 г 3 раза в день. МСД – 2 г. Ступенчатая терапия при инфекциях кожи и мягких тканей – внутривенно 200–400 мг 2 раза в день 3–21 день, затем *per os* 500–750 мг 2 раза в день 6–121 день. При остеомиелите 500–750 мг 2 раза в день курсом 51–81 день. При интраабдоминальной инфекции (перитонит) – 0,75–2 г / 6 ч. *per os* или лучше интраперитонеально 200 мг затем 25 мг/л в каждый объем диализата в течение 10 дней. Показан при инфекциях мочеполовой системы, включая гонорею, ЖКТ и желчевыводящих путей, органов дыхания, ЛОР органов, зубов, полости рта, кожи и мягких тканей, костей и суставов, глаз, септицемии, интраабдоминальной инфекции и т.п. Средний курс лечения 5–14 дней.

**Офлоксацин** (таривид, заноксин, флоксин, флобацин)  $T_{1/2}$  – 7 ч. Хуже, чем ципрофлоксацин, действует на *P. aeruginosa*, пневмококк и энтерококк, но более активен против золотистого стафилококка.

**Форма выпуска** – таблетки по 0,1 и 0,2 г, для парентерального введения – во флаконах по 0,2 г препарата. Назначается *per os* по 0,2 г 2 раза в день, при тяжелых рецидивирующих инфекциях дозу можно удвоить. При очень тяжелых инфекциях начинают терапию с внутривенного введения 200–400 мг, а после улучшения состояния переходят на *per os*. Внутривенно офлоксацин вводится капельно в 200 мл 0,9% раствора NaCl или 5% раствора глюкозы. При остром гонорейном уретрите 0,4 однократно. При респираторной инфекции и при инфекциях урогенитальной области по 200–400 мг 2–3 раза в день

**Ломефлоксацин** (максаквин)  $T_{1/2}$  – 6,5–7,13 ч. Бактерицидное действие на широкий спектр большинства грам(–) микробов, включая энтеробактерии, легионеллы, *M. catharralis*, большинство изолятов псевдомонад; многие грам(+) микроорганизмы, такие как стафилококки, включая метициллин резистентные изоляты, стрептококки (*S. pneumoniae*); внутриклеточные возбудители (хламидии, микоплазмы, легионеллы, бруцеллы). Слабо активен против большинства анаэробных бактерий, энтерококков; не действует на грибы, вирусы, возбудитель сифилиса. Оказывает воздействие на микобактерии туберкулеза и показан как альтернативный препарат в терапии туберкулеза, особенно деструктивных форм.

Вместе с метронидазолом дает синергический эффект. Биодоступность свыше 99%. Накапливается в эритроцитах, фагоцитарных

клетках в 4–8 раз выше, чем в плазме, легочной ткани и жидкости, предстательной железе. С мочой выделяется 65% препарата (концентрация в 100 раз выше, чем в плазме).

*Форма выпуска* – таблетки по 400 мг. Показан при инфекционных заболеваниях дыхательных путей, включая туберкулез, как препарат 2-го ряда, хламидийных и уреаплазменных инфекциях 400–600 мг ССД в течение 7–14 дней, при смешанной инфекции – более длительно. Острая неосложненная инфекция мочевых путей – 400 мг *per os* 1 раз в день в течение 3–5 дней, а при хронической инфекции 400 мг/12 часов, курс 7–14 дней (особенно при хроническом простатите до 94% излеченных). При ожогах и раневой инфекции до 400 мг 1 р. в день.

*Пефлоксацин* – (пеплацин, абактал)  $T_{1/2}$  – 9 ч.; близок по активности к ципрофлоксацину и офлоксацину, но лучше действует на хламидии, хуже на микоплазмы и уступает ципрофлоксацину по активности на псевдомонады и *S. aureus*. Всасывается на 100% и хорошо проникает через ГЭБ, хорошо распределяется в органах и тканях, включая костную.

*Форма выпуска* – таблетки по 0,2; 0,4 г и в ампулах по 0,4 г препарата. ССД – 0,8 г; МСД – 1,2 г; курс 5–14 дней. Назначают *per os* по 0,2–0,4 г 2 раза в день, при тяжелом состоянии вначале применяют внутривенно капельно (400 мг в 250 мл 5% раствора глюкозы), а затем переходят на *per os*. По сравнению с другими фторхинолонами отличается высокой билиарной экскрецией и достигает высокой концентрации в желчи, широко применяется для лечения кишечных инфекций и инфекционно-воспалительных заболеваний желчевыводящих путей. Показан также при инфекциях мочевыводящих путей, гинекологических заболеваниях; кожи и мягких тканей, костей суставов, сепсисе, эндокардите, перитоните, раневой и ожоговой инфекции, нейроинфекции, включая менингит. Применяют для лечения и профилактики послеоперационных осложнений. При смешанной инфекции брюшной полости и малого таза комбинируют с антибиотиками с активностью против анаэробов (метронидазол, клиндамицин и др.). При синегнойной инфекции обычно комбинируют с аминогликозидами, пиперацилином, азлоциллином, цефтазидимом для усиления эффекта.

*Норфлоксацин* (нолицин, норбактин)  $T_{1/2}$  – 4 ч.; эффективен в отношении более чем 90% наиболее часто встречающихся возбудителей инфекций мочевыводящих путей. *Спектр действия*: *E. coli*; *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp* и другие энтеробактерии, *Neisseria gonorrhoeae* и стафилококки. Менее активен против псевдомонад. Создает повышенную концентрацию в ЖКТ и мочевыводящих путях.

Выпускается в таблетках по 0,4 и 0,8 г. Назначается *per os* до еды по 200–400 мг 2 раза в сутки; при остром гонорейном уретрите 0,8 г однократно, МСД 1600 мг; курс лечения 7–10 дней, при хронической инфекции мочевыводящих путей – до 12 недель; хронический бактериальный простатит – 4–6 нед, бактериальный гастроэнтерит – до 5

дней, острая гонорея – 3–7 дней или назначают однократную дозу 800 – 1200 мг. В целях предотвращения часто повторяющихся инфекций мочевыводящих путей назначают 200 мг вечером в течение 1–2 лет.

#### 5.14.3 Третье поколение – фторхинолоны

*Левифлоксацин* (таваник, *levaguin*) – левовращающий изомер офлоксацина. *Форма выпуска* – табл. 250–500 мг, 500 мг раствор для инфузий. Показан при остром синусите 500 мг 1 р. в день; хроническом бронхите и внебольничной пневмонии 500 мг 1 р. в день; инфекциях мочевых путей 250 мг 1 р. в день; инфекциях кожи и мягких тканей 250–500 мг 1 р. в день; при ВВ введении 500 мг 2 р. в день.

#### 5.14.4 Четвертое поколение – фторхинолоны

*Моксифлоксацин* –  $T_{1/2}$  – 4 ч. Новый антимикробный препарат для лечения респираторных инфекций. Широкий спектр антимикробного действия, включая грам(+) и грам(–) аэробные и анаэробные бактерии. Связывается с белками (альбумином) 39%. 20% препарата в неизменном виде выводится с мочой.

*Форма выпуска* – 400 мг в таблетках. Показан при внебольничной пневмонии 400 мг 1 р. в день в течение 10 дней; заболеваниях верхних дыхательных путей, включая синуситы, 400 мг 1 р. в день курсом 7–10 дней.

### 5.15 Оксазолидиноны

*Линезолид* (*Linezolidum*, род. *Linezolidi*) N-[[[(5S)-3-[3-Фтор-4-(4-морфолинил)фенил]-2-оксо-5-оксазолидинил]метил]ацетамид  $T_{1/2}$  – 5,2 и 4,26 ч. Связывается с бактериальными рибосомами, предотвращает образование функционального иницирующего комплекса 70S – важного компонента процесса трансляции при синтезе белка.

*Формы выпуска* – 400 или 600 мг в виде таблеток для приема внутрь, раствор для инфузий 2 мг/мл в бутылках по 100, 200 и 300 мл. Вводят в/в капельно в дозе 600 мг 2 раза в сутки для взрослых. Показано лечение инфекций, вызванных чувствительными грамположительными микроорганизмами: вызванные резистентными к ванкомицину изолятами *E. faecium*, госпитальная пневмония, вызванная *S. aureus* (метициллиночувствительные и метициллинорезистентные изоляты) или *S. pneumoniae* (включая полирезистентные изоляты), внебольничная пневмония, вызванная *S. pneumoniae* (включая полирезистентные изоляты), осложненные инфекции кожи и мягких тканей, включая инфекции при синдроме диабетической стопы, не сопровождающиеся остеомиелитом, вызванные *S. aureus* (метициллиночувствительные и метициллинорезистентные изоляты), *S. pyogenes* или *Streptococcus agalactiae*. Резистентны к линезолиду: *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Neisseria spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Pseudomonas spp.*

## 5.16 Нитрофураны

*Механизм действия.* Бактериостатический эффект обеспечивается ароматической нитрогруппой за счет ингибиции ДНК–полимеразы.

*Спектр активности.* Подавляют активность грам(+) (стрептококки, энтерококки, пенициллин резистентные стафилококки) и грам(–) бактерий (*E. coli*, сальмонеллы, шигеллы, протей, клебсиеллы, энтеробактер), простейших, включая трихомонады (только фуразолидон) и лямблии. Слабо влияют на возбудителей гноеродной и газовой инфекции. Мало активны против анаэробов, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*. Активность сохраняется в присутствии продуктов тканевого распада.

*Нитрофуразон* (фурацилин) используется местно как антисептик. В настоящее время в связи с высокой устойчивостью к нему госпитальной флоры в условиях стационара малоэффективен.

*Фуразолидон* действует преимущественно на грам(–) бактерии, а также лямблии и трихомонады. Плохо всасывается из ЖКТ. *Форма выпуска* – таблетки по 0,05 г и гранулы 50 г (растворить в 100 мл теплой кипяченой воды). *Per os* по 0,1–0,2 г 4 раза в день. МСД – 0,8 г. Показан при кишечных инфекциях бактериальной и протозойной (лямблиоз) этиологии; при инфекциях мочевыводящих путей не назначают. Раствор 1:25000 применяют для местного лечения ожогов и раневых инфекций.

*Нитрофурантоин* (фурадонин) – хорошо всасывается в ЖКТ и создает высокие концентрации в моче и низкие в крови. При кислой реакции мочи эффект усиливается. *Форма выпуска* – таблетки по 0,03 и 0,5 г и растворимые в кишечнике по 0,1 г. По 0,1–0,15 г 3–4 раза в день во время или после еды; курс лечения 5–8 дней. МСД – 0,8 г *per os*. Препарат показан при лечении инфекционных заболеваний мочевых путей и профилактики при урологических операциях и процедурах (при остром пиелонефрите не рекомендуется из-за низкой концентрации в ткани почек).

*Фурагин* – порошок, таблетки по 0,05 г и фурагин растворимый в виде смеси, содержащей 10% фурагина и 90% раствора NaCl для внутривенного введения. Назначают *per os* 3–4 раза в день после еды или внутривенно капельно по 300–500 мл 1% раствора в течение 3–4 ч. Показания см. нитрофурантоин. Местно применяют раствор 1:13000 на 0,9% NaCl для промываний и спринцеваний в хирургической практике для лечения гнойных ран, ожогов, свищей.

## 5.17 Производные нитроимидазола

*Механизм действия.* Превращаются в активную форму после восстановления нитрогрупп препарата в нитрозогидроксила–миногруппы путем переноса электронов, осуществляемое белком, аналогичным ферредоксину теплокровных в анаэробных условиях. Подобное превращение препятствует выходу препарата из клетки и приводит к

накоплению его в концентрации в 10–100 раз превышающих таковые во внеклеточной среде. Депонированный препарат вызывает множественные нарушения структуры ДНК (связывается с ДНК и предотвращает образование нуклеиновых кислот).

*Спектр активности* – бактерицидное действие. К препаратам чувствительны трихомонады, лямблии, амебы, балантидии, спирохеты, клостридии (перфрингенс и диффициле), *H. pylori*, *G. vaginalis*, анаэробы: бактероиды, включая *B. fragilis*, фузобактерии, анаэробные стрептококки. Хорошо всасывается в ЖКТ и из прямой кишки (пища не влияет). Распределяется во всех органах и тканях и проникает через ГЭБ. Метаболизируется в печени, выводится с мочой и желчью.

*Метронидазол* (трихопол, метрогил)  $T_{1/2}$  – 8 ч. *Форма выпуска* – таблетки 0,2; 0,25; 0,4 г; ампулы 0,1 г и 0,5 г во флаконе вместе со 100 мл воды для внутривенных капельных вливаний (0,5% раствор). *Per os* 0,25–0,5 г 3–4 раза в день (7,5 мг/кг/6 ч.); МСД 4 г. Внутривенно капельно – 500 мг 2 раза в сутки не быстрее 5 мл/мин. Показан в качестве моно или комбинированной терапии при лечении чувствительных к нему инфекционных агентов: чаще при анаэробной инфекции в брюшной полости, протозойных инфекциях, хеликобактериозе, псевдомембранозном колите, неспецифическом вагините.

*Тинидазол*  $T_{1/2}$  – 12–14 ч. По спектру активности, побочным эффектам и показаниям близок к метронидазолу. Выпускается в таблетках по 0,5 г. Для лечения анаэробной инфекции: 1-й день – 2,0 г, затем по 1,0 г 1–2 раза в день. Для лечения неспецифического вагинита, острого язвенного гингивита, урогенитального трихомониаза и лямблиоза – 2,0 г 1 раз в день или в течение двух дней 4,0 г. С целью профилактики послеоперационных инфекций назначают 2,0 г за 12 часов до операции.

### 5.18 Сульфаниламидные препараты – являются производными сульфаниловой кислоты.

*Механизм действия.* Бактериостатики, конкуренты парааминобензойной кислоты (ПАБК), необходимой большинству бактерий для синтеза фолиевой кислоты, которая используется микробной клеткой для образования нуклеиновых кислот. В средах, содержащих ПАБК (гной, разрушенные ткани, а также новокаин и анестезин), препараты малоэффективны.

*Спектр активности.* Широкий спектр действия.

*Высокочувствительны:* стрептококк, стафилококк, пневмококк, менингококк, гонококк, кишечная палочка, сальмонелла, холерный вибрион, сибиреязвенная палочка, гемофильные бактерии; хламидии: возбудители трахомы, пситтакоза, орнитоза, пахового лимфогранулематоза; простейшие: плазмодий малярии, токсоплазма; патогенные грибы, актиномицеты, нокардии, кокцидии.

*Умеренно чувствительны:* энтерококки, зеленящий стрептококк,

протей, анаэробы, клостридии, туляремии, бруцеллы, микобактерии лепры, простейшие (лейшмании).

*Устойчивы:* сальмонеллы, синегнойная, коклюшная и дифтерийная палочки, микобактерии туберкулеза, спирохеты, лептоспиры; госпитальные изоляты микроорганизмов.

За исключением VI группы (см. ниже) хорошо всасываются в ЖКТ, распределяются в организме и проникают через ГЭБ. Метаболизируются в печени и выводятся с мочой и желчью. Активность резко возрастает при щелочном pH мочи. Запивать щелочной минеральной водой или содой, чтобы избежать кристаллурии в кислой среде.

*Показаны* при инфекциях верхних дыхательных путей (отиты, синуситы, но не тонзилфарингит) возможна комбинация с эритромицином; инфекции мочевыводящих путей (острый цистит); токсоплазмоз, малярия (в сочетании с пириметамином), нокардиоз. В настоящее время используют только при легком течении инфекции или при аллергии к антибиотикам.

*Сульфадиазин* (сульфазин, сульфаргин) – мазь 30 г в тубе. Более активен, так как меньше связывается с альбуминами плазмы и проникает через ГЭБ, но плохо растворяется в моче и не используется для лечения инфекций мочевыводящих путей. Назначают 2–4 г (начальная доза), затем 0,5–1,0 / 4–6 ч. *per os*, при нокардиозе 8–12 г/сутки.

*Сульфацетамид* (сульфацил–натрий, альбуцид) – хорошо растворим в воде и в виде 10–30% раствора применяется в качестве глазных капель. *Форма выпуска* – флаконы и тюбики–капельницы с 20–30% раствором. Глазные капли закапывают по 2 капли в глаз / 6 ч. Показан при конъюнктивитах, блефаритах, гнойных язвах роговой оболочки микробной этиологии, а также для профилактики гонобленнореи новорожденных.

*Сульфадиазин серебра* – является составной частью мази «Дермазин» (содержащей 1% препарата, а также масло и проленгликоль). *Форма выпуска* – тубы по 50 г и банки по 250 г. Применяют в качестве наружного антибактериального средства для лечения ожоговых ран. Мазь наносят на поврежденную поверхность слоем 2–4 мм 2 раза в день.

*Фталилсульфатиазол* (фталазол) – порошок и таблетки по 0,5 г. Практически не всасывается в ЖКТ и создает высокие концентрации в просвете кишечника. Препарат широко использовали при кишечных инфекциях (дизентерии), в связи ростом устойчивости шигелл применяется редко. Назначают 1,0 г 4–6 раз в день; на курс лечения 25–30 г. МСД – 7 г.

*Сульфагуанидин* (сульгин) – порошок и таблетки по 0,5. Назначают *per os* 1–2 г от 3 до 6 раз в день; МСД– 7 г. Курс лечения 5–7 дней. Всасывается частично в ЖКТ и создает менее высокую концентрацию в просвете кишечника.

### 5.19 Ингибиторы дигидрофолат–редуктазы

*Ко–тримоксазол* (септрин, бактрим, бисептол, орибакт, сулотрим, ориприн)  $T_{1/2}$  – 9 ч. Высокоэффективная комбинация сульфаниламидов с триметопримом, обеспечивающая значительное увеличение степени и спектра антимикробной активности. Активен против грам(+) кокков (стрептококки, исключая энтерококки и *S. pyogenes*; стафилококки, включая *PRSA*, для *MRSA* активность возможна в повышенных дозах); грам(–) кокков (гонококки, *M. catarrhalis*) и грам(–) бактерий (бруцеллы, листерии, микоплазмы, хламидии, токсоплазмы, плазмодии, пневмоцисты). Не активен против псевдомонад, анаэробов и возбудителя сифилиса.

*Механизм действия* – комбинация лекарственных веществ обеспечивает двойную блокаду в синтезе тетрагидрофолата и обладает синергическим бактерицидным эффектом. Синергизм является следствием ингибирования только дигидрофолатредуктазы (ДГФР) двумя ингибиторами. Эффективен при лечении инфекций, вызванных грамположительной и грамотрицательной флорой, устойчивой к другим сульфаниламидам.

*Фармакокинетика.* Быстро и практически полностью всасывается в ЖКТ и выводится преимущественно с мочой; высокие концентрации в бронхиальном секрете, желчи, моче, предстательной железе, внутреннем ухе. Сульфаметоксазол на 60%, а триметоприм на 50% связывается белком сыворотки. В легких и почках определяется более высокая концентрация препарата, чем в других тканях. В организме подвергается ацетилированию; 40–50% триметоприма и около 60% сульфаметоксазола выделяется с мочой. Элиминация препарата из крови происходит длительно (более 36 часов). В течение 48 часов экскретируется 60% триметоприма, 80% общего и 37,4% свободного сульфаниамида. Максимальные уровни концентрации препаратов в моче наблюдаются от 2 до 8 ч.

Выпускается в таблетках по 120 мг – содержит 100 мг сульфаметоксазола и 20 мг триметоприма; по 480 мг – 400 мг сульфаметоксазола + 80 мг триметоприма; сироп содержит в 5 мл 200 мг сульфаметоксазола + 40 мг триметоприма; ампула или флакон для внутривенных вливаний по 5 (480 мг) и 10 мл. Принимается 2–3 раза в день по 0,48 г. Дозировка рассчитывается по триметоприму обычно 5–10 мг/кг/сутки курсом 7–14 дней, но при пневмоцистной пневмонии до 20 мг/кг/сутки курсом до 3 нед.

Показан при инфекциях верхних и нижних дыхательных путей, включая пневмоцистную пневмонию; мочевыводящих путей (при остром цистите курс 3 дня) и простатите (при остром курс до 4–5 нед, при хроническом – до 3 мес.); желчевыводящих путей; кишечных инфекциях (шигеллез, сальмонеллез); инфекциях кожи, мягких тканей, костей, суставов; септицемии, препарат резерва при хламидиозе, гонорее. При шигеллезе – 2,5 мг/кг/6 ч.



## 5.20 Препараты «разных» групп

**Фузидин.** *Механизм действия* – предотвращает связывание аминоксил-тРНК (образует устойчивый комплекс фузидин-GDP-рибосома-EFG или EF<sub>2</sub>). *Спектр действия* – действует бактериостатически, при повышении дозы в 3–4 раза оказывает бактерицидное действие. Активен в отношении грам(–) и грам(+), в том числе, MRSA, к нему чувствительны многие изоляты листерий, клостридий (включая *C. difficile*), микобактерии, не влияет на стрептококк. Обладает слабым противовирусным эффектом (аденовирусы). Хорошо всасывается в ЖКТ, накапливается в суставах, не проникает через ГЭБ, с мочой выводится < 1%. Выпускается в таблетках по 0,125 и 0,25 г; гранулы по 2,5 г фузидиевой кислоты для приготовления суспензии. Применяется *per os* 0,5 г/8 часов за 1–1,5 часов до еды, ССД – 1,5 г, МСД – 3 г. Для лечения заболеваний, вызванных устойчивыми к другим антибиотикам стафилококками (продуцирующим β-лактамазу), а также для лечения псевдомембранозного колита.

**Фосфомицин (фосфоцин)** T<sub>1/2</sub> – 2,5 ч. Мало токсичен. *Механизм действия* – подавляет первый этап синтеза пептидогликана клеточной стенки (является структурным аналогом фосфоэнола пирувата, вступает в конкурентное взаимодействие с ферментом N-ацетил-глюкозамино-3-о-энолпирувил-трансферазой и необратимо специфично ингибирует его). Препарат широкого спектра действия, оказывает бактерицидное действие на грам(+) (стафилококки и стрептококки, включая *E. faecalis*) и грам(–) бактерии (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, ряд изолятов псевдомонад) и микроорганизмы, устойчивые к другим антибиотикам. Слабо активен против энтерококков и MRSA, не действует на анаэробы. 30% препарата всасывается в ЖКТ. Хорошо распределяется в организме, через ГЭБ проникает при воспалении мозговых оболочек. Активно концентрируется в почках и выводится в неизмененном виде с мочой.

**Форма выпуска** – капсулы 0,5 г; суспензия – 0,25 г в 5 мл; флаконы по 1,0 и 4,0 г порошка. Применяется как препарат резерва при воспалительных заболеваниях мочевыводящих путей, кишечных инфекциях, при пневмониях, интраабдоминальных и тазовых инфекциях, инфекциях кожи, мягких тканей, костей и суставов, сепсисе, эндокардитах, для профилактики инфекции мочевых путей при хирургическом вмешательстве. *per os* по 0,5 г /6 ч. или 1,0 г /8 ч. Вводится внутривенно медленно струйно или лучше капельно 2,0–4,0 г/ 6–8 ч.; ССД – 200 мг/кг, МСД – 16 г. 1 г препарата растворяется в 10 мл, 4 г в 100 мл изотонического р-ра NaCl или 5% раствора глюкозы.

### 5.20.1 Производные хиноксолина

*Диоксидин* – синтетический препарат широкого спектра действия (нарушает синтез ДНК) и активен в отношении протей, *K. pneumoniae* (палочки Фридлендера), синегнойной, кишечной и дизентерийной палочек, сальмонелл, стафилококков, клостридий (бактерицидный эффект). *Форма выпуска* – ампулы по 10 мл 1% раствора для внутриполостного и местного применения и ампулы по 10 и 20 мл 0,5% раствора для внутривенного, внутриполостного и местного применения; 5% мазь в тубах по 25 и 50 г. Применяется при тяжелых гнойно–воспалительных процессах различных локализаций, включая пневмонию, сепсис, перитонит – внутривенно капельно по 15–30 мл 0,5% раствора в 5% растворе глюкозы (МСД – 0,6–0,9 г в 2–3 приема) или в полость через дренажную трубку, катетер или шприц от 10 до 50 мл 1% раствора (МСД – 0,7 г). В виде 5% мази, 1% и 0,5% раствора применяют для лечения гнойных ран, ожогов, трофических язв, гнойничковых заболеваний кожи [120, 121, 122].

## 6. АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ

После внедрения антибиотиков в клиническую практику стали широко распространяться устойчивые бактерии. Частота обнаружения пенициллиноустойчивых стафилококков доходит до 90-98%, стрептомициноустойчивых – до 60-70%. Тревогу усиливает ситуация, когда и к новым клинически важным антимикробным препаратам также быстро формируется антибиотикорезистентность, так, например, к ванкомицину до 15-20% устойчивых грам(+) изолятов энтерококков, известны изоляты, устойчивые к имипенему и меропенему. В настоящее время устойчивость микроорганизмов к антибиотикам является одним из самых важных факторов, ограничивающих эффективность проводимой антибактериальной терапии [123, 124].

Так как открытие новых антибиотиков происходит параллельно скорости развития устойчивости к ним микроорганизмов, сегодня нет уверенности в том, что создание новых антимикробных препаратов будет идти впереди развития резистентности бактерий. Многие проблемные микроорганизмы, например, стафилококки, продуцирующие пенициллиназу, ацинетобактер, энтерококки, по-прежнему, представляют собой трудную клиническую задачу, несмотря на появление новых эффективных антибиотиков. Возрастает число данных о горизонтальном транспорте генов в природе между различными микроорганизмами не только одного вида, но и рода, стабильного поддержания генов резистентности за счет ко-селекции не только антибиотиков, но и других пока мало изученных факторов.

Среди факторов, способствующих распространению антибиотикорезистентности, в том числе плазмидной и хромосомной, играют роль: возрастание миграции населения, туризм, урбанизация, более широкое использование антимикробных препаратов в мире.

Мощное влияние на антибиотикорезистентность оказывает самостоятельное бесконтрольное применение антибиотиков населением. Треть жителей российских городов используют антимикробные препараты без консультации с врачом, приобретая их в аптечной сети, где они находятся в свободной продаже. В то же время в большинстве стран Европы, Соединенных Штатах Америки (США), Японии существует достаточно чёткая система государственного контроля за применением антибиотиков, которые отпускаются только по рецепту [125, 126], что является мощным фактором сдерживания роста резистентности микроорганизмов. Так, по данным Европейской системы наблюдения за микробной резистентностью (EARSS) в Скандинавских странах и Нидерландах устойчивость микрофлоры самая низкая, а в странах Юго-Восточной Европы самая высокая. Это связано с политикой строгого инфекционного контроля в Скандинавии и Нидерландах [127].

Отмечается связь между масштабом применения антимикробных препаратов и частотой устойчивых возбудителей инфекционных процессов. Исследования коллекций клинически значимых микроорганизмов, которые были выделены в «доантибиотическую эру», не выявили у них резистентности к препаратам, применяемым в медицинской практике. Однако после начала использования новых антибиотиков сообщения об устойчивости к ним появляются очень быстро [128, 129].

Одной из важнейших причин появления и распространения антибиотикорезистентности является нерациональное применение антимикробных препаратов в медицине, которое значительно ухудшает качество лечения, способствует формированию госпитальных изолятов микроорганизмов, приводит к неоправданным потерям крайне ограниченных финансовых ресурсов в развивающихся странах [130]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в среднем почти 75% противомикробных средств назначаются нерационально [131].

Резистентность микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам только начинает рассматриваться как социальная проблема, как реальная угроза состоянию здоровья людей, глобальной и национальной безопасности. В 2001 году ВОЗ выдвинула новую Глобальную стратегию сдерживания распространения устойчивости к противомикробным препаратам, которая представляет собой схему и научно-обоснованные мероприятия, обеспечивающие сдерживание распространения устойчивых микроорганизмов. Одним из её ведущих пунктов является надзор за резистентностью микроорганизмов, применением и потреблением антибиотиков.

Важным событием 2002 года стало утверждение Международного Координационного Совета стран Содружества Независимых Государств (СНГ) по профилактике ВБИ и мониторингу устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам, куда входит Республика Беларусь [132].

Согласно позиции специалистов ВОЗ, Европейского центра по профилактике и контролю заболеваний (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC), проблема устойчивости к антимикробным препаратам, в т. ч. к антибиотикам, уже не является прогнозом на будущее и представляет собой серьезную опасность, поскольку антибиотикорезистентные изоляты бактерий все шире распространяются по всему миру независимо от региона или страны. Использование антибиотиков в ветеринарии, в животноводстве для нужд производства пищевых продуктов и в сельском хозяйстве превышает уровни их использования у людей, что является дополнительным фактором, влияющим на возникновение резистентных микроорганизмов, которые легко могут распространяться среди людей, животных, продуктов и в окружающей среде [133, 134].

Европейская сеть по надзору за устойчивостью к антимикробным средствам (EARSNet), координацию работы которой осуществляет ECDC в

Стокгольме, проводит сбор данных из 27 стран-членов ЕС, а также из Исландии и Норвегии. Надзор осуществляется в отношении семи наиболее патогенных бактерий, имеющих значение для общественного здравоохранения: *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Национальные сети этих 29 стран систематически осуществляют сбор данных из клинических лабораторий в каждой стране; в настоящее время общее число лабораторий превышает 900, и они обслуживают 1400 больниц. Создаваемая в результате база данных, которая охватывает почти 400 млн человек, предоставляет не только данные по странам и динамику проблемы устойчивости бактерий, но также и сравнимые результаты для большей части Европейского региона ВОЗ. Она представляет собой важный источник информации по устойчивости к антибиотикам для руководителей, врачей, ученых и широкой общественности. К системе сбора данных, которые могут быть использованы органами, отвечающими за эпиднадзор на национальном уровне, таких как WHONET, присоединилась и Республика Беларусь [135, 136].

Одной из наиболее актуальных проблем в этой области является изучение микробиологических, молекулярно-генетических и эпидемиологических свойств возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Согласно определению ВОЗ, ИСМП – это инфекции, развивающиеся у пациентов во время получения медицинской помощи в больнице или другом медицинском учреждении, которые отсутствовали и не находились на стадии инкубационного периода у пациентов на момент их госпитализации. Также в группу ИСМП включают и инфекционные заболевания медицинского персонала, возникновение и развитие которых связано с выполнением прямых служебных обязанностей. Одним из подходов к классификации ИСМП является их подразделение на группы в соответствии с природой этиологического фактора, а именно с условным выделением таких групп возбудителей инфекционных заболеваний, как «патогенные» и «условно-патогенные». Особого внимания заслуживают ИСМП, обусловленные условно-патогенными микроорганизмами (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* и т. д.) ввиду значительного эпидемического потенциала возбудителей, относящихся к данной группе, их высокой устойчивости к агрессивным факторам окружающей среды, в т. ч. антимикробным средствам [137, 138].

### **6.1 Фенотипическая и генотипическая резистентность к антимикробным препаратам**

Природная чувствительность микробов к антибиотикам связана с наличием в их составе определенных структур, мишеней, синтез которых антибиотики нарушают, или звеньев метаболизма, которые они блокируют, а природная устойчивость (резистентность) – с отсутствием у

бактерий таких мишеней [123, 139, 140]. К наиболее хорошо изученным мишеням действия антибиотиков относят клеточную стенку (пептидогликан), цитоплазматическую мембрану, рибосомы, митохондрии, генетические структуры (ДНК нуклеоида) или отдельные этапы синтеза нуклеиновых кислот, белка, липидов, энергетического метаболизма. Следовательно, природная резистентность есть генетически обусловленное отсутствие чувствительности бактерий к антибактериальным средствам, например, микоплазмы не имеют клеточной стенки и резистентны к пенициллинам.

Приобретенная устойчивость связана с изменением фенотипа или генотипа микроба. Изменение мишеней действия антибиотиков приводит к развитию устойчивости к ним бактерий, в этом случае может возникать полная или частичная перекрестная устойчивость для антибиотиков с аналогичным или близким механизмом действия. Приобретенная устойчивость может возникать и при синтезе ферментов, разрушающих антибиотики, например,  $\beta$ -лактамаз, разрушающих  $\beta$ -лактамные препараты. При синтезе  $\beta$ -лактамаз широкого спектра действия возможна также перекрестная устойчивость.

При фенотипической устойчивости происходит повышение резистентности к антибиотикам у большинства особей популяции, без изменения генотипа (вызвана феноменом репрессии-депрессии генов хромосомы или плазмид) и устойчивость носит временный и адаптивный характер. Генотипическая устойчивость может возникать в результате одно- или многоступенчатой мутации в хромосоме или R-плазмидах, а также путем передачи R-плазмиды или участка хромосомы, ответственного за устойчивость, путем конъюгации, трансдукции или трансформации от устойчивой особи к чувствительной, селекции устойчивых клонов микроорганизмов. При передаче R-плазмиды возможно формирование устойчивости ко многим антимикробным веществам, и к появлению множественно-резистентных изолятов. В чувствительной к антибиотикам популяции первоначально возникают устойчивые единичные рекомбинанты или мутанты. В неселективной среде, т.е. среде, не содержащей антибиотик, мутанты обычно элиминируются, так как не имеют преимуществ, в селективной среде, наоборот, быстро становятся доминирующими.

Выделяют два типа приобретенной резистентности бактерий: первичная и вторичная, между которыми не существует строгих различий.

Первичная резистентность бактерий имеет место до начала лечения антибиотиками (например, устойчивость некоторых изолятов пневмококка к ампициллину). Вторичная резистентность бактерий возникает или возрастает в процессе применения антибактериальных препаратов.

С точки зрения генетики частота резистентности обусловлена двумя процессами: распространением генов, детерминирующих устойчивость, и распространением резистентных клонов микроорганизмов. У микроорганизмов также принято различать устойчивость возбудителей

госпитальных и внегоспитальных инфекций. Среди последних наибольшее практическое значение имеет распространение устойчивости среди возбудителей инфекций дыхательных путей (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*), ЖКТ (*Shigella spp.*, *Salmonella spp.*), мочевыводящих путей (*E. coli* и других энтеробактерии), инфекций передаваемых половым путем (гонококк), а также микобактерий туберкулеза [140].

## **6.2 Механизмы резистентности микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам**

Механизмы резистентности микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам и другим химиотерапевтическим препаратам сложны и разнообразны. Наиболее хорошо изучены следующие механизмы резистентности:

- превращение активной формы антибиотиков в неактивную путем ферментативной инактивации и/или модификации (наиболее часто встречается выработка  $\beta$ -лактамаз, разрушающих  $\beta$ -лактамное кольцо пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов и карбапенемов путем катализа гидролиза амидной связи в  $\beta$ -лактамном кольце);
- блокирование специфических рецепторов для химиотерапевтических препаратов;
- утрата проницаемости клеточной стенки для определенного антибиотика;
- изменение структуры клеточных структур-мишеней для антибиотика (например, пенициллинсвязывающих белков, рибосом);
- нарушение в системе специфического транспорта данного препарата в бактериальную клетку;
- возникновение у микроорганизмов альтернативного пути образования жизненно важного метаболита (метаболический шунт), заменяющего основной путь, заблокированный препаратом, например, за счет синтеза новых ферментов;
- формирование биопленки [123].

Достаточно хорошо изучен только первый механизм: выработка бактериями (протеем, кишечной палочкой, клебсиеллой, стафилококками, гемофильной палочкой, синегнойной палочкой)  $\beta$ -лактамаз – экзоферментов, разрушающих  $\beta$ -лактамное кольцо пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов и карбапенемов.  $\beta$ -лактамазы, продуцируемые грам(+) микробами, выделяются из клетки в межклеточное пространство, а продуцируемые грам(-) бактериями циркулируют между наружной и внутренней мембранами [47].

У одного и того же вида бактерий могут существовать несколько механизмов резистентности, тип которой определяется химической структурой антибиотика и свойствами бактерий [139].

### 6.3 Вторичная резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам

Вторичная устойчивость у бактерий может развиваться по двум типам:

- быстро, одноступенчато, скачкообразно – описан как «стрептомициновый» вид резистентности;
- относительно медленно, многоступенчато – описан как «пенициллиновый» вид резистентности.

Первый тип характерен для макролидов, рифамицинов, аминогликозидов, фузидина. В этом случае рекомендуется назначать антибиотики коротким курсом или обязательно комбинировать с другими препаратами.

Второй тип резистентности описан для линкозамин, тетрациклин, пенициллин, левомицетин, ристомидин, цефалоспорины, карбапенемы, фосфомицин, монобактамы, гликопептиды [47, 123].

### 6.4 Механизмы резистентности микроорганизмов к отдельным группам антибиотиков

#### *β-лактамы антибиотиков*

Ферментативная инактивация. Наиболее распространенным механизмом устойчивости микроорганизмов к β-лактамам является их ферментативная инактивация в результате гидролиза одной из связей β-лактамного кольца ферментами β-лактамазами. К настоящему времени известно более 200 ферментов, которые встречаются у подавляющего большинства клинически значимых микроорганизмов, кроме микроорганизмов рода *Streptococcus*.

Снижение проницаемости внешних структур грамотрицательных бактерий. Внешняя мембрана грамотрицательных микроорганизмов является препятствием для проникновения β-лактамов внутрь клетки. Транспорт антибиотика через внешнюю мембрану к чувствительным мишеням осуществляется через «порины» или «пориновые каналы». В результате мутаций возможна утрата поринов, приводящая к выраженному снижению чувствительности к β-лактамам. Данный механизм резистентности присущ практически всем грамотрицательным бактериям, часто в сочетании с другими механизмами.

Активное выведение β-лактамов из микробной клетки. В последние годы появились данные о наличии у *P.aeruginosa* транспортных систем, осуществляющих активное выведение β-лактамов из бактериальной клетки, прежде всего, карбапенемов.

Модификация мишени действия. Мишенями действия β-лактамов являются ферменты – транспептидазы и карбоксипептидазы, участвующие в синтезе клеточной стенки бактерий. В результате их модификации



уменьшается сродство к  $\beta$ -лактамам, что проявляется в снижении клинической эффективности антибиотиков данной группы. Клиническое значение модификации мишени действия имеет устойчивость среди стафилококков и пневмококков.

$\beta$ -лактамные антибиотики деактивируются в поверхностных слоях биоплёнки значительно быстрее, чем проникают через ее матрикс.

#### Аминогликозиды

Ферментативная инактивация. Основным механизмом устойчивости к аминогликозидам является их ферментативная инактивация путем модификации. Модифицированные молекулы аминогликозидов утрачивают способность связываться с рибосомами и подавлять биосинтез белка.

Снижение проницаемости внешних структур. Проникновение аминогликозидов через мембраны бактерий является сложным процессом. Низкая природная чувствительность к аминогликозидам некоторых микроорганизмов (например, *B.cereacia*) связана именно с недостаточной проницаемостью для антибиотиков внешней мембраны этих микроорганизмов. Мутации, приводящие к изменению структуры липополисахарида у *E.coli* и *P.aeruginosa*, могут приводить к повышению устойчивости к аминогликозидам.

Модификация мишени действия. Основной мишенью действия аминогликозидов является 30S субъединица бактериальной рибосомы, в некоторых случаях устойчивость может быть связана с ее модификацией.

Положительно заряженные молекулы аминогликозидов притягиваются к негативно заряженным полимерам матрикса БП, снижая скорость их проникновения, что даёт время бактериям выработать адаптивный стрессовый ответ.

#### Хинолоны/Фторхинолоны

Изменение структуры ферментов-мишеней является ведущим механизмом устойчивости к фторхинолонам (хинолонам). При этом происходит модификация двух бактериальных ферментов ДНК-гиразы (топоизомеразы II и топоизомеразы IV), опосредующих конформационные изменения в молекуле бактериальной ДНК, необходимые для ее нормальной репликации. Мутационные изменения и аминокислотные замены в молекулах ферментов могут происходить в любой из четырех субъединиц ДНК-гиразы. Чаще дефекты возникают в субъединице A, реже – в субъединице B. Аналогичные изменения могут касаться генов, кодирующих топоизомеразу IV (мутации по *parC*, *grlA*, *parE*, *grlB*). Наиболее высокий уровень резистентности развивается в случаях двух- или трехступенчатых мутаций по той или другой субъединице или одновременно в различных генах. В то же время для нарушения развития бактериальной клетки бывает достаточно подавления активности только одного фермента, что связано с различными функциями двух топоизомераз. При этом имеется сродство хинолонов к ДНК-гирaze

грамотрицательных бактерий, а у грамположительных бактерий первичной мишенью действия является топоизомераза IV.

Другим механизмом, обеспечивающим уменьшение активности хинолонов, является снижение проницаемости внешней мембраны бактерий за счет изменения проницаемости пориновых каналов или липополисахаридного слоя. В этом случае снижается проницаемость мембраны не только для хинолонов, но и для антибактериальных препаратов других классов (аминогликозиды,  $\beta$ -лактамы).

Активное выведение. Результаты современных исследований указывают на широкое распространение среди грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов устойчивости, связанной с активным выведением хинолонов. У изолятов с высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам этот механизм часто сочетается с модификацией мишеней. Реализация этого механизма, связанная с функцией определенных клеточных ферментов, приводит к резкому снижению внутриклеточной концентрации препарата. В ряде случаев данный механизм сочетается с модификацией мишеней.

#### *Макролиды и линкозамиды*

Модификация мишени действия. Основной мишенью действия макролидов, кетолидов и линкозамидов является 50S субъединица бактериальной рибосомы. Все эти антибиотики имеют общий участок связывания с рибосомой. У большинства бактерий устойчивость возникает в результате метилирования 23S-субъединицы рРНК. Метилазы широко распространены среди аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Активное выведение. Активное выведение макролидов и линкозамидов осуществляют несколько транспортных систем. Основное клиническое значение имеет система выведения, кодируемая *mef*-геном, распространенная среди *S.pneumoniae*, *S.pyogenes* и многих других грамположительных бактерий.

Ферментативная инактивация. Ферменты, инактивирующие макролиды и линкозамиды, встречаются у грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Некоторые из них обладают широким субстратным профилем (макролидфосфотрансферазы *E.coli* и *Staphylococcus* spp.), другие инактивируют только отдельные антибиотики (эритромицинэстеразы распространены среди семейства *Enterobacteriaceae*, линкомицинацетилтрансферазы – среди стафилококков и энтерококков).

#### *Тетрациклины*

Активное выведение. Этот механизм является наиболее распространенным среди грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Детерминанты резистентности обычно локализованы на плазмидах, что обеспечивает их быстрое внутри- и межвидовое распространение.

Защита рибосомы. Описано семейство защитных белков, которые позволяют бактерии синтезировать белок, несмотря на связывание с рибосомой молекулы тетрациклина. Механизм подобной защиты неизвестен. Частота устойчивости к тетрациклинам среди клинически наиболее значимых микроорганизмов достаточно высока, что не позволяет рассматривать их как средства выбора для лечения большинства инфекций.

Тигециклин может преодолевать два основных механизма резистентности микроорганизмов, наблюдаемых в отношении тетрациклинов: рибосомальную защиту и активное выведение

#### *Гликопептиды*

Модификация мишени действия. Механизм действия гликопептидов заключается в блокировании завершающей стадии синтеза пептидогликана путем связывания молекулы антибиотика с концевыми аминокислотами в боковой пептидной цепочке (D-аланин-D-аланин).

Экзополисахаридный матрикс вокруг бактерий в составе биопленки значительно снижает проникновение гликопептидов.

#### *Сульфаниламиды и ко-тримоксазол*

Формирование метаболического шунта. Резистентность к триметоприму может являться результатом приобретения генов дигидрофолатредуктазы, нечувствительной к ингибции, а устойчивость к сульфаниламидам – генов дигидроптератсинтетазы. Гены ферментов, устойчивых к ингибированию, часто находятся в составе подвижных генетических элементов в ассоциации с генами, детерминирующими устойчивость к другим антибиотикам.

Модификация мишени действия. Устойчивость может также сформироваться в результате мутаций в генах указанных ферментов.

#### *Хлорамфеникол*

Ферментативная инактивация (ацетилирование) является основным механизмом устойчивости к хлорамфениколу. Гены ферментов – хлорамфениколацетилтрансфераз, как правило, локализуются на плазмидах и входят в состав транспозонов в ассоциации с генами устойчивости к другим АБ.

#### *Полимиксины*

Полимиксины оказывают бактерицидное действие на грамотрицательные бактерии, нарушая целостность цитоплазматической мембраны, действуя подобно поверхностно активным веществам. Приобретенная устойчивость отмечается редко.

#### *Оксазолидиноны*

Резистентность микроорганизмов по отношению к линезолиду развивается медленно путем многостадийной мутации 23S рибосомальной РНК и происходит с частотой менее  $1 \cdot 10^{-9}$  –  $1 \cdot 10^{-11}$  [140, 141].

## 6.5 Механизмы образования устойчивых популяций микроорганизмов

Схематично образование устойчивых популяций микроорганизмов согласно клонально-селекционной теории можно представить так:

1. В результате спонтанной мутации (одна мутация на  $10^5$ - $10^7$  особей) в бактериальной популяции происходит образование отдельных резистентных особей (второй вариант – уже присутствуют природно устойчивые клоны).
2. Далее повышение количества резистентных особей происходит путем генетических рекомбинаций, на фоне действия антимикробного агента (искусственная селекция особенно актуальна в госпитальных условиях).
3. Формирование высокоустойчивых бактериальных популяций происходит путем селекции за счет подавления роста чувствительных к препарату микроорганизмов (особенно при назначении низких доз антибиотиков и антисептиков, частой смене препаратов).
4. Циркуляция устойчивых изолятов в отделениях от пациента к пациенту и за счет носительства среди персонала и пациентов (при сапронозах – влияние гигиенических условий в помещениях стационара) [139].

## 6.6 Развитие резистентности в клинических условиях

Резистентность в клинических условиях может развиваться в результате:

- спонтанных мутаций: одноступенчатых по стрептомициновому типу или в результате серий небольших многоступенчатых мутаций, в течение нескольких дней (последующая селективная мультипликация резистентных клонов приводит к их доминированию);
- селекции естественно, первично устойчивых изолятов, во время лечения антибиотиком или антисептиком чувствительные клоны погибают, а естественно устойчивые размножаются и занимают биологическое пространство, созданное для них антимикробным препаратом;
- передачи генов от других микроорганизмов в результате генетических рекомбинаций, когда гены резистентности передаются вследствие конъюгации, трансдукции или трансформации.

Конъюгация – передача генетической информации с помощью плазмид. Передача информации не всегда происходит с помощью плазмид. Интегративные элементы (NBU) имеют небольшие размеры, вырезаются из хромосомы в присутствии конъюгативных транспозонов. NBU после освобождения из бактериальной хромосомы мобилизуется в ковалентно замкнутую кольцевую нереплицирующую форму. Попадая к реципиенту NBU, которые обнаружены только у *Bacteroides spp.*, интегрируются в его

геном и могут переносить гены антибиотикорезистентности.

Трансдукция – передача генетической информации с помощью умеренных, трансдуцирующих бактериофагов генов резистентности, особенно часто при стафилококковой инфекции.

Трансформация – непосредственная передача генов резистентности (фрагмента ДНК) от донора реципиенту (зависит от степени гомологичности ДНК).

Конъюгация и трансдукция представляют собой наиболее распространённые механизмы передачи генетического материала у бактерий. Наиболее благоприятные условия для передачи генов у микроорганизмов создаются в месте их наибольшего скопления в толстой кишке [123].

Условия, пригодные для передачи генов, создаются главным образом в толстой кишке. В качестве векторов для передачи выступают бактериофаги и плазмиды, которые в виде транспозонов встраиваются в геном донора. Возможна передача сразу набора генов резистентности к наиболее часто используемым антибактериальным препаратам. Множественная устойчивость обеспечивает бактериям преимущества при условии широкого применения антибиотиков и антисептиков [139].

Формирование возбудителями БП приводит к развитию резистентности в клинических условиях благодаря нарушению проникновения антибиотиков через матрикс биоплёнки, экспрессии генов стрессового ответа, вариации фаз роста, персистирующим микроорганизмам, недостатку питательных веществ в толще биопленки.

### **6.7 Факторы, способствующие селекции и распространению антибиотикорезистентных изолятов**

Принято считать, что массовой селекции и распространению антибиотикорезистентности среди бактерий способствуют факторы:

- нерациональное и бесконтрольное применение антибиотиков и антисептиков для лечения инфекций и, особенно, для их профилактики;
- использование пищевых продуктов, содержащих антибиотики [123, 139].

Применение антибиотиков в стоматологии, косметологии, в сельском хозяйстве, в ветеринарии создает условия для селекции устойчивых изолятов. Проблему могут также создавать антибиотики в почве в относительно низких концентрациях за счет своих естественных продуцентов.

Наличие в почве солей тяжелых металлов также ведет к селекции бактерий и росту количества резистентных изолятов. Последнее связано с тем, что интегрированные опероны содержат вместе гены антибиотикорезистентности и гены резистентности к тяжелым металлам (ко-селекция).

## **6.8 Борьба с лекарственно устойчивыми бактериями**

Меры борьбы с лекарственно устойчивыми бактериями разрабатываются сразу в нескольких направлениях:

1. Получение новых химиотерапевтических препаратов, которые отличаются от существующих по механизму действия:

- получают моноклональные антитела к липиду А (структурный компонент эндотоксина) грам(-) бактерий, ингибирующие активацию рецепторов на макрофагах;
- проводится разработка и испытание препаратов, препятствующих адгезии бактерий на клетках макроорганизма.

2. Химическая модификация известных антибиотиков с защищенными активными группами, устойчивыми к бактериальным ферментам:

- совместное использование с известными антибиотиками ингибиторов бактериальных ферментов (например, сульбактам необратимый ингибитор  $\beta$ -лактамаз и ампициллин).

3. Воздействие на биопленку (предотвращение ее образования и ее разрушение) [123].

## **6.9 Ограничение развития устойчивости к противобактериальным препаратам**

Ограничение развития устойчивости к противобактериальным препаратам может быть достигнуто следующим образом:

- следует избегать неправильного, нерационального использования антибиотиков: применять только при наличии показаний, в определенных дозах (небольшие дозы антибиотиков способствуют селекции устойчивых клонов микроорганизмов), соблюдать интервалы между введениями, применять в течение определенного времени;
- комбинировать препараты только по показаниям, например, при туберкулезе, смешанной полимикробной инфекции, тяжелых, неотложных состояниях и т. п.;
- постоянно контролировать уровень резистентности микроорганизмов у пациентов стационаров и амбулаторно;
- ограничение на применение антибиотиков, что предполагает соглашение между клиницистами и микробиологами, т.е.: ограничение использования антибиотиков в клинической практике, животноводстве и т.п.; ограничить использование нового препарата до тех пор, пока проявляют эффективность уже используемые средства.
- поиск методов предотвращения формирования биопленки в очаге инфекции.

Борьба с антибиотикорезистентностью путем организационных мероприятий (исключением на определенное время антибиотиков) не

может решить всех проблем. Системы генного транспорта, их взаимодействие, зависимость стабильности генов резистентности от природных факторов, обуславливающих ко-селекцию, в настоящее время недостаточно изучены.

### 6.10 $\beta$ -лактамазы

Наиболее распространенным механизмом устойчивости микроорганизмов к  $\beta$ -лактамам является их ферментативная инактивация в результате гидролиза одной из связей  $\beta$ -лактамного кольца ферментами  $\beta$ -лактамазами. К настоящему времени описано более 200 ферментов, различающихся по следующим свойствам:

- субстратный профиль (способность к преимущественному гидролизу тех или иных  $\beta$ -лактамов, например пенициллинов или цефалоспоринов, или тех и других в равной степени).
- локализация кодирующих генов (плазмидная или хромосомная). Эта характеристика определяет эпидемиологию резистентности. При плазмидной локализации генов происходит быстрое внутри- и межвидовое распространение резистентности, при хромосомной – наблюдают распространение резистентного клона.
- чувствительность к применяющимся в медицинской практике ингибиторам: клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму.

$\beta$ -лактамазы встречаются у подавляющего большинства клинически значимых микроорганизмов, важным исключением являются микроорганизмы рода *Streptococcus*.

Все известные в настоящее время  $\beta$ -лактамазы делят на 4 молекулярных класса, в пределах которых ферменты характеризуются общностью свойств и выраженной гомологией. Предполагается, что  $\beta$ -лактамазы классов А, С и D эволюционировали из бактериальных пенициллиносвязывающих белков в почвенных экосистемах в результате селективного прессинга  $\beta$ -лактамных антибиотиков, продуцируемых некоторыми микроорганизмами.  $\beta$ -лактамазы перечисленных классов относятся к ферментам «серинового» типа (по аминокислоте, находящейся в активном центре фермента). Ферменты класса В относятся к металлоэнзимам, поскольку в качестве кофермента в них присутствует атом цинка, их происхождение менее ясно.

К наиболее распространенным ферментам относятся стафилококковые  $\beta$ -лактамазы (встречаются у 60-80% изолятов) и  $\beta$ -лактамазы широкого спектра грамотрицательных бактерий (среди изолятов *E.coli* встречаются в 30-40% случаев). Несмотря на широкое распространение перечисленных ферментов, они не представляют серьезной проблемы для терапии, поскольку многие современные  $\beta$ -лактамы (цефалоспорины II-IV поколений, ингибиторозащищенные пенициллины, карбапенемы) не чувствительны к гидролизу.

Хромосомные  $\beta$ -лактамазы класса В, разрушающие карбапенемы, распространены среди редких видов микроорганизмов, например, *S.maltophilia*.

Продукция  $\beta$ -лактамаз находится под контролем плазмидных и хромосомальных генов. Их выработка может быть индуцирована или опосредована конституционально (практически каждая бактерия несет в ДНК хромосомы потенциальный запас закодированных  $\beta$ -лактамаз).

Плазмидные – общие у близких видов бактерий, вырабатываются в больших количествах, отличаются широким спектром, способны гидролизовать как пенициллины, так и цефалоспорины

Хромосомные – не являются общими для различных видов, наблюдается тенденция к видоспецифичности, гидролизуют в основном или пенициллины, или цефалоспорины, вырабатываются в незначительных количествах, применение  $\beta$ -лактамов может индуцировать выработку высоких концентраций  $\beta$ -лактамаз.

Пути преодоления антибиотикорезистентности микроорганизмов, обусловленной продукцией  $\beta$ -лактамаз:

1. Синтез новых соединений, относящихся к известным классам, и/или поиск принципиально новых классов антимикробных препаратов.
2. Применение комбинаций антибиотиков.
3. Применение ингибиторов  $\beta$ -лактамаз. Основным эффектом ингибитора является подавление действия ферментов, что обеспечивает защиту антибиотиков от гидролиза. Ингибиторы обладают собственной умеренной антибактериальной активностью в отношении ряда микроорганизмов, например, сульбактам в отношении *Acinetobacter spp.*, что клинически проявляется в выраженном синергизме с  $\beta$ -лактамами антибиотиками.

### **6.11 Причины развития повышенной резистентности микроорганизмов, способных формировать биоплёнки**

Антибактериальные химиопрепараты – вещества, избирательно угнетающие жизнедеятельность микроорганизмов. Под избирательным действием понимают активность только в отношении возбудителей инфекции, при сохранении жизнеспособности клеток хозяина, и действие не на все, а на определенные роды и виды микроорганизмов и паразитов. Антибиотики эффективны в отношении живых, особенно быстрорастущих форм микроорганизмов и оказывают слабое воздействие на медленно растущие формы или споры. Все антибактериальные препараты, несмотря на различия химической структуры и механизма действия, объединяет ряд уникальных качеств. Во-первых, в отличие от большинства других лекарственных средств, мишень (рецептор) антибактериальных препаратов находится не в тканях человека, а в клетке микроорганизма. Во-вторых, активность препаратов не является постоянной, а снижается со



временем, что обусловлено формированием лекарственной устойчивости (резистентности). Резистентность – неизбежное биологическое явление и предотвратить ее практически невозможно. В-третьих, резистентные возбудители представляют опасность не только для пациента, у которого они были выделены, но и для многих других людей, даже разделенных временем и пространством. Поэтому борьба с лекарственной устойчивостью в настоящее время приобрела глобальные масштабы [79].

#### 6.11.1 Нарушение проникновения антибиотиков через матрикс биоплёнки

Диффузию антибиотиков в матриксе биоплёнки изучают методами измерения концентрации препаратов, а также визуализации бактерицидного эффекта в толще биоплёнки. В целом, проникновение АБ через БП не является лимитирующим фактором, кроме нескольких исключений.  $\beta$ -лактамы антибиотики деактивируются в поверхностных слоях значительно быстрее, чем проникают через матрикс биоплёнок, сформированных  $\beta$ -лактамазопозитивными *K. pneumoniae*. Положительно заряженные молекулы аминогликозидов притягиваются к негативно заряженным полимерам матрикса, снижая скорость их проникновения, что даёт время бактериям выработать адаптивный стрессовый ответ. Исследования показали, что скорость проникновения аминогликозидов через матрикс БП *P. aeruginosa* значительно снижалась из-за связи с внеклеточным альгинатом, однако значимо восстанавливалась при добавлении альгинатлиазы. Отмечено (табл. 6.1), что внеклеточная слизь, полученная из БП, значимо снижает активность гликопептидов, даже по отношению к планктонным формам [142].

Таблица 6.1 – способность антибиотиков проникать через биопленку, образованную различными возбудителями

Микроорганизм	Антибиотик	Проникновение	Источник
<i>P. aeruginosa</i>	Пиперациллин	Проникает	143
	Имипенем	Проникает	143
	Офлоксацин	Проникает	143
	Ципрофлоксацин	Проникает	143, 144
	Левифлоксацин	Хорошо проникает	143
	Спарфлоксацин	Проникает	143
	Гентамицин	Снижено проникновение	143
<i>P. aeruginosa</i>	Амикацин	Снижено проникновение	143
	Ко-тримоксазол	Снижено проникновение	144
	Амоксициллин + клавуланат	Хорошо проникает	144
	Фосфомицин	Проникает	144
<i>E. coli</i>	Фосфомицин	Проникает	144
	Амоксициллин + клавуланат	Проникает	144
	Ципрофлоксацин	Проникает	144

Микроорганизм	Антибиотик	Проникновение	Источник
<i>K. pneumoniae</i>	Ампициллин	Не проникает	145
	Ципрофлоксацин	Проникает	145
<i>S. epidermidis</i>	Ванкомицин	Снижено проникновение	147
	Ципрофлоксацин	Проникает	147
	Цефотаксим	Проникает	147
	Хлорамфеникол	Проникает	147
	Имипенем	Проникает	147
	Тетрациклин	Проникает	147
	Линезолид	Проникает	148
<i>S. aureus</i>	Ванкомицин	Снижено проникновение	147
	Ципрофлоксацин	Проникает	147
	Цефотаксим	Снижено проникновение	147
	Хлорамфеникол	Проникает	147
	Имипенем	Проникает	147
	Тетрациклин	Проникает	147

#### 6.11.2 Гены стрессового ответа

Под воздействием неблагоприятных факторов окружающей среды, повреждения или нехватки питательных веществ, бактерии начинают экспрессировать гены стрессового ответа, включая некоторые  $\sigma$ -факторы. Эти гены защищают бактерию от действия антибиотиков, иммунной системы, токсинов. Например, сальмонелла, лишённая альтернативного  $\sigma$ -фактора оказывается значительно более чувствительной к оксидативному стрессу. Другой  $\sigma$ -фактор – RpoS, экспрессируемый грам(-) бактериями в стационарной фазе роста, был обнаружен как в биоплёнке *P.aeruginosa*, так и в мокроте пациентов с муковисцерозом [149].

#### 6.11.3 Вариация фаз роста

В то время как контроль большинства генов постепенен, изменение фазы роста происходит по механизму «всё или ничего». Способность менять фазы роста была обнаружена у многих бактерий, включая *P.aeruginosa* и *S.aureus*. Изменение фенотипа по типу «маленьких колоний» под действием антибиотиков происходит как *in vitro*, так и при развитии заболевания. Интересно, что «маленькие колонии» проявляют высокий уровень образования биоплёнок и резистентности к АБ. Однако, влияние способности формировать биоплёнки на изменение фаз роста до конца ещё не изучено [150].

#### 6.11.4 Персистирующие микроорганизмы

Концепция «персистеров» основывается на предположении, что существуют антибиотики, которые не убивают, а повреждают бактериальные клетки, что приводит к запуску клеточного апоптоза. Последующее развитие резистентности происходит из-за ингибирования запрограммированной клеточной смерти в субпопуляциях бактерий, находящихся в фазе отсутствия роста. Регуляторные механизмы стадии

персистенции до конца не описаны, однако могут использовать гены стрессового ответа или смены фазы роста [151].

#### *6.11.5 Недостаток питательных веществ*

Дефицит питательных веществ в толще матрикса биоплёнок был обнаружен с помощью меченых радиоизотопами аминокислот. Как кислород, так и глюкоза концентрируются в поверхностных слоях биоплёнки, что ведёт к образованию анаэробных ниш в толще БП. Зоны активного синтеза протеинов, например, зеленого флуоресцирующего пигмента, находятся в поверхностных слоях, где в достаточном количестве есть кислород и питательные вещества. Этот биологически активный слой может иметь размеры от 2 мкм до 46 мкм (при культивировании с азотом и кислородом, соответственно). Поскольку поверхностные слои БП являются метаболически активными, то они могут быть подвержены воздействию антибиотиков. В таком случае, БП может быть разрушена слой за слоем АБ, например, влияющими на синтез белка. Однако АБ-терапия может остановить процесс деления, но не уничтожает эти клетки. В результате продолжающийся расход питательных веществ снижает их проникновение в глубокие слои БП и оставляет их в резистентной стадии покоя [152].

#### *6.11.6 Резистентность, как активный адаптивный процесс*

Изменение экспрессии генов в растущей биоплёнке приводит к скоординированному формированию особенной структуры и повышению антимикробной толерантности. Эта гипотеза подтверждается наличием повышенной антибиотикорезистентности у биоплёнок слишком тонких, чтобы препятствовать проникновению антибиотиков к клеткам. Концепция специфического «биоплёночного» фенотипа интересна ещё и тем, что по имеющимся данным, экспрессия генов регулируется межклеточными сигнальными молекулами. Наличие у бактерий пороговых концентраций сигнальных молекул приводит к активации с последующей супрессией генов, ответственных за экспрессию факторов вирулентности, влияет на формирование БП и повышает резистентность к антибиотикам [153]. Таким образом, биопленка является сложной трехмерной биологической структурой высшей организации жизнедеятельности микробов, в чем-то напоминающей многоклеточный организм, обладающий очень важной особенностью – успешно противостоять внешним факторам агрессии. Многие аспекты функционирования данной многоуровневой системы до сих пор остаются не изученными.

## 7. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ В МИКРОБИОЛОГИИ. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК

Все многообразие методов исследования в микробиологии условно разделяют на:

Прямые (непосредственно определяется микроорганизм и/или его антиген, продукты жизнедеятельности и т.п.):

- прямое микроскопическое исследование;
- микроскопия окрашенных препаратов;
- РИФ или использование антител с ферментной меткой к антигенам возбудителя, конфокальная микроскопия;
- электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия;
- культуральное (бактериологическое) исследование – посев на питательные среды, выделение чистой культуры бактерии и идентификация;
- хроматография (например, жирных кислот при анаэробной инфекции).

В настоящее время к прямым методам также относят лабораторные исследования, которые непосредственно определяют антигены (ПЦР, РА, РП, ИФА и т.п.).

В отличие от прямых методов, в непрямых методах о наличии микроорганизмов возбудителей инфекционных заболеваний судят по уровню антител к ним и наличию сенсибилизации к его антигенам.

Непрямые методы: ИФА, РА, РПГА, РТГА, РНИФ, ВИЭФ, РБТЛ, кожно-аллергические пробы.

К методам, которые визуализируют ультраструктуру микробных сообществ, можно отнести электронную микроскопию и конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (CLSM). Другие методы основаны на сорбции молекул красителя на структурах биопленки с последующей их отмывкой (десорбцией) в органические растворители. Такой способ индикации биопленок наиболее часто используется в статических методах культивирования микробных биопленок и позволяет дать условную количественную характеристику образовавшимся микробным сообществам. Чем больше образуется матрикс биопленки, тем больше красителя сорбируется на его поверхности и тем выше оптическая плотность образца [154, 155].

Измерение биолюминесценции (BPI) – достаточно новый метод изучения и детекции биопленок, который можно использовать как *in vitro*, так и *in vivo*. При искусственном введении в бактерии плазмид, ответственных за синтез люминесцирующего белка, можно проводить визуализацию как адгезированных бактерий, так и матрикса биопленки [156].

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) стал сравнительно недавно использоваться для изучения биопленок в медицине,

этот метод часто совмещается с методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Метод гибридизации применяют для детекции и определения расположения специфических мРНК в клетках, образующих биопленки, что позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов в бактериях. С помощью этого метода определена неоднородность бактерий в биопленке и выявлены клетки-персистеры, ответственные за выживание популяции во время воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды и действия антимикробных препаратов [157, 158].

Открытие биопленок является одним из наиболее важных достижений медицины последних XX века [159]. Вопросы формирования и исследования их роли в патологических процессах представляют большой интерес. Одними из первых в этом направлении были выполнены работы А. Т. Henrici (1933) и J. W. Costerton (1977) [160, 161].

Одна из первых научных статей, в которой подробно приведен и описан метод культивирования, индикации и изучения способности формирования микроорганизмами биопленок в медицинской практике, была опубликована в 1985 году. В этой работе G. D. Christensen и соавторы описали использование спектрофотометрического метода исследования для индикации выделенной «внеклеточной слизи» коагулазонегативными стафилококками, полученными из разных источников. Данные микроорганизмы были выбраны для исследования в связи с появлением работ, в которых обсуждалась их роль в развитии катетер-ассоциированного сепсиса [162]. Авторы последующих работ использовали тот же принцип, либо его модификации для получения и индикации биопленок [163, 164]. В своем исследовании G.D. Christensen для фотометрического определения образования биопленок применил методику, описанную М. Fletcher в работах 1976 и 1977 гг., в которых изучалась адгезия галофильных микроорганизмов на различных гладких поверхностях. G. D. Christensen еще не использует термин «биопленка» в отношении адгезированных форм коагулазонегативных стафилококков, а говорит о способности выделять внеклеточную слизь.

С 1985 произошло значительное расширение возможностей изучения формирования биопленок микроорганизмами в медицине. Основное направление последующих исследований было связано с разработкой методов культивирования микроорганизмов в виде БП на различных объектах. С ранних этапов развития методологии выращивания микробных сообществ доминируют два направления исследований: культивирование в динамических (имитация естественных условий обитания микроорганизмов) и статических условиях.

К динамическим можно отнести методы с использованием биореакторов (лабораторных ферментеров). Общая суть методов заключается в культивировании микроорганизмов в питательной среде без добавления дополнительных питательных веществ. Таким образом, создаются условия для постоянного потока жидкости, содержащей

микроорганизмы. Первоначальная адгезия микроорганизмов происходит на поверхности системы фильтров и/или на внутренних частях биореактора. В последующем адгезированные микроорганизмы образуют матрикс биопленки [165, 166].

Другим примером динамического метода можно считать культивирование в аппарате Робинсона и в его различных модификациях. В этом методе используют аппарат сложной конструкции, обеспечивающий ток питательной среды, которая соприкасается с пластинами из искусственного или биологического материала, на поверхности которого находятся адгезированные клетки микроорганизмов в логарифмической фазе роста. В результате в условиях постоянного доступа питательных веществ и аэрации образуется БП [167].

Проточный метод можно отнести к микроциркуляторным методам. Биопленка микроорганизмов образуется на поверхности силиконовых трубок проточных ячеек, через которые с помощью помпы постоянно подается питательная среда. Такой метод позволяет моделировать процессы образования биопленки на стерильных объектах, например, на внутрисосудистых катетерах [168].

Основным преимуществом динамических методов формирования биопленок является максимальное приближение к условиям живых систем. Постоянное поступление питательных веществ и удаление продуктов жизнедеятельности микроорганизмов позволяет значительно интенсифицировать процесс формирования БП. Условия, обеспечивающие жизнедеятельность микроорганизмов в биопленке, полученной такими методами, стандартизированы, а влияние посторонних факторов минимизировано. В модификациях метода Робинсона и в проточном методе возможно изучение процесса образования или подавления биопленок в реальном времени с использованием световой микроскопии. К недостаткам данной группы методов можно отнести их ограниченное использование в связи с большими объемами потребления питательных сред, сложной конструкцией оборудования, затруднением стерилизации внутренних поверхностей аппаратов, низкой производительностью методов, высокой стоимостью эксплуатации.

Вторая группа методов основана на создании статических условий культивирования микроорганизмов. Наиболее часто используемой техникой среди данной группы является метод с применением пластиковой посуды в различных модификациях. Популярность этого метода стала расти с середины 90-х годов прошлого столетия, что было обусловлено его удобством, высокой производительностью и наглядностью. Суть метода можно охарактеризовать следующим образом: суспензия бактерий вносится в лунки планшета, после инкубации в оптимальных условиях планктонная фаза популяции бактерий удаляется вместе с питательной средой, образовавшиеся биопленки выявляются различными способами.

Этот метод до сих пор не потерял своей значимости, однако научный интерес отечественных исследователей к нему в последнее время значительно снизился, а практическое значение так и не получило должной оценки. В первую очередь, это связано с тем, что для этого метода не разработаны стандарты, позволяющие унифицировать его в разных лабораториях. Уже в ранних работах была отмечена разная адгезивная способность одних и тех же изолятов микроорганизмов к различным поверхностям. Данный факт связан с тем, что все микроорганизмы, включая необразующие БП, обладают способностью прикрепляться к органическим и неорганическим поверхностям, а адгезия является пусковым механизмом в развитии инфекционного процесса [169].

Некоторые авторы разделяют прикрепление бактерий к поверхностям на неспецифическое и специфическое. Первое обусловлено физико-химическими процессами взаимодействия бактерий с поверхностью: электростатические и гидрофобные взаимодействия, броуновское движение. Неспецифическое прикрепление осуществляется к биотическим и абиотическим объектам и в большей степени обратимо. Специфическое прикрепление происходит после молекулярных взаимодействий между молекулами-адгезинами и рецепторами клеток хозяина. Немаловажную роль в адгезии микроорганизмов к различным поверхностям играют также электрические заряды. Бактериальная поверхность заряжена отрицательно, причем у грамположительных микроорганизмов это обусловлено наличием в клеточной стенке тейхоевых и липотейхоевых кислот, а у грамотрицательных – присутствием кислых липополисахаридов и белков [170, 171].

Более сложная модель изучения биопленки получила название микрокосмос (*microcosm*), которая более близко имитирует естественные условия образования матрикса БП. Она может включать различные виды микроорганизмов и материал изучаемой среды. Примером такого варианта является использование гидроксиапатита и ротовой жидкости для формирования модели дентальной биопленки [172].

Промежуточное положение между исследованием *in vitro* и *in vivo* занимают модели *ex vivo*, для формирования которых выполняется забор ткани или органа и их перенос на искусственную среду [173, 174, 175].

Исследование микробных биопленок может выполняться с использованием лабораторных животных, что является наиболее адекватной и приближенной к реальным условиям модели наблюдения данных микробных сообществ. Экспериментальные работы на животных позволяют определить особенности патогенеза инфекционных заболеваний [176, 177].

Таким образом, использование планшетов даже одного производителя может приводить к получению различных результатов, что обусловлено их физико-химическими особенностями. Так, например, некоторые производители выпускают планшеты со специфическим связыванием углеводов, аминов, ДНК, сульфгидрильных групп; со

специальной обработкой поверхности для клеточной адгезии, в том числе и покрытые полилизинном для белковой кристаллизации. Необходимо учитывать тот факт, что к поверхности лунок планшетов микроорганизмы прикрепляются за счет неспецифических факторов. Помимо особенностей поверхности планшета, на формирование биопленок в данной группе методов влияют состав питательных сред (микронутриентный и электролитный) и степень аэрации.

Одной из модификаций планшетного метода исследования формирования биопленок является ALI-метод (*air-liquid interface*). Его суть заключается в культивировании микроорганизмов в планшете, который находится под углом  $30^{\circ}$ - $50^{\circ}$  таким образом, чтобы мениск жидкой питательной среды соприкасался с серединой дна лунки. Середина лунки является наиболее оптически чистой зоной планшета. В месте соприкосновения жидкой питательной среды с этой зоной формируются максимально благоприятные условия для формирования биопленки. Этот метод позволяет визуализировать биопленки без необходимости использования красителей с помощью фазово-контрастной микроскопии, а мониторинг можно проводить в режиме реального времени. Его недостатком является возможное уменьшение объема питательной среды в лунке и, как следствие, нарушение контакта адгезированных микроорганизмов с питательной средой. По этой причине возникает необходимость постоянного внесения питательной среды в лунки либо уменьшения времени инкубации [178].

В связи с возрастающим интересом врачей всех специальностей к проблеме биопленок был разработан метод их формирования на гидроксиапатитовых дисках. В дальнейшем метод был стандартизирован, в нем стали использовать поликарбонатные диски. Суть метода заключается в следующем: на поверхность плотной питательной среды помещают диск, на который наносят суспензию исследуемой культуры. Питательные вещества поступают к клеткам путем диффузии через поры поликарбонатного диска. Таким образом, это единственный из разработанных статических методов, при котором к биопленке питательные вещества поступают из плотной среды. Метод рекомендуется авторами исследований как основной для выявления влияния антимикробных веществ на формирование биопленок [178].

Отдельно следует отметить метод, разработанный D.E. Kadouri с соавторами, который занимает промежуточное положение между статическими и динамическими методами. В методе используются 6-луночные планшеты, к каждой лунке которых подведена система подачи и отвода питательной среды. После определенного времени инкубации, достаточного для адгезии бактерий на поверхности лунки, подключается система микроциркуляции, которая обеспечивает оптимальное поступление питательных веществ к формирующейся биопленке [178].

В современной микробиологии существует целый ряд методов, позволяющих выращивать микроорганизмы, имеющие медицинское



значение, для изучения биопленок. Эти методы дают возможность изучать особенности жизнедеятельности микробных биопленок, скорость и условия их формирования, проводить визуальное наблюдение в режиме реального времени, исследовать адгезивную способность микроорганизмов к абиотическим и биотическим объектам, влияние химических и физических факторов на формирование и разрушение биопленок, выявлять в популяции микроорганизмов изоляты, обладающие повышенной способностью к образованию биопленок. Несмотря на все вышеперечисленное, большинство методов, позволяющих культивировать микроорганизмы в виде биопленок, используются в основном в научных исследованиях и не находят применения в клинической практике.

Таким образом, на современном этапе микробиологические методы позволяют всесторонне и детально изучать различные аспекты строения и функционирования микроорганизмов, активно разрабатываются методы изучения микробных сообществ – биопленок.

### **7.1 Бактериологический или культуральный метод**

Метод основан на выделении из исследуемого материала и идентификации культуры микроорганизмов, используя питательные среды. Бактериологический метод позволяет проводить исследования материала от пациента, объектов внешней среды [179].

Выделение чистой культуры микроорганизма обычно проводят в 3 или 4 этапа. При использовании высокоселективных сред возможно сокращение до 2 этапов, т.е. выделенную культуру на селективной среде сразу идентифицируют и одновременно определяют ее чувствительность к антимикробным препаратам.

Посев материала (после предварительной микроскопии) на чашку с плотной питательной средой (лучше дифференциально-диагностической или целый ряд селективных) с целью выделения изолированных колоний. Исследования производят методом механического разобщения (в настоящее время чаще используют набор селективных сред). В ряде случаев, например, при исследовании крови, материал предварительно засевают в обогащенную жидкую среду с последующим пересевом на чашку с агаровой средой. Для выделения ряда микроорганизмов до посева необходимо проводить селективную обработку материала (с учетом свойств выделяемого микроорганизма, например, обработка кислотой мокроты для выделения кислотоустойчивых микобактерий туберкулеза). Микроорганизмы чаще всего культивируют при оптимальной температуре для большинства видов – 37°C. Время культивирования для разных видов бактерий может колебаться.

Колонии, выросшие на чашке с агаром, внимательно изучают и проводят отбор наиболее типичных. Мазки, полученные из этих колоний, готовят и окрашивают по Граму или другими методами и отсевают половинку исследованной колонии на среду для накопления чистой

культуры. Чистоту выделенной культуры контролируют визуально и микроскопически. С этой целью готовят мазок, окрашивают его чаще по Граму, изучают морфологические и тинкториальные признаки. Идентификацию чистой культуры проводят по совокупности признаков (морфологических, биохимических, серологических и т.п.) по сравнению со свойствами типовых изолятов (руководствуясь справочными данными) или с использованием коммерческих тест-систем.

Коммерческие тест-системы для быстрой биохимической идентификации основаны на определении биохимических свойств микроорганизмов. Существует огромное разнообразие тест-систем для идентификации, основанных на учете изменения субстратного профиля (в том числе хромогенного или флуорогенного субстрата). Регистрация результатов при этом возможна визуальная, инструментальная и полностью автоматическая с последующей обработкой полученных результатов, как просто с использованием идентификационных таблиц, так и компьютерной обработкой. В качестве материала для идентификации используют чаще всего чистую культуру, из которой готовят суспензию в концентрации стандарта оптической плотности, затем раствор суспензии вносят в лунки с субстратами данной тест-системы. Стрип инкубируется при оптимальной температуре 18 часов или более в термостате при заданных условиях, или 4-6 часов при использовании ускоренных тестов. Учет может осуществляться автоматически, используя фотометр с последующей компьютерной обработкой данных или визуально. В последнем случае результат биохимической реакции оценивают в виде «+» или «-» и вносят в таблицу, получая определенный числовой профиль, который сравнивают со стандартными прилагающимися к данной тест-системе. Разработкой тест-систем для идентификации микроорганизмов занято не менее 20 известных фирм, среди них следует назвать: *Becton Dickinson*, *Abbott Diagnostics*, *Difco/Pasco Laboratories*, *Roche Diagnostics*, *Vitek Systems*, *BioMerieux*. Тест-системы, разработанные вышеперечисленными фирмами, позволяют ускорить диагностику многих видов микроорганизмов до 4-6 часов с момента выделения чистой культуры. Степень совпадения данных по идентификации вида бактерии, полученной с помощью тест-систем, с референс-методами достигает 85-91%. Однако, результаты сильно зависят от вида микроорганизма и возможности его биохимической идентификации (в ряде случаев преимущество имеет серологическая классификация, например, сальмонелл, где возможности определения по биохимическим признакам ограничены). Существуют отечественные тест-системы для идентификации возбудителя и определения его антибиотикорезистентности: «ИД-ЭНТ» и «ИД-АНА», «АБ-ГРАМ(-)», «АБ-ПСЕВ», «АБ-СТАФ», «АБ-ЭНТЕР» и «АБ-АН» [180].

В патологическом материале от пациента часто присутствует ассоциация микроорганизмов, которая может включать представителей нормальной микрофлоры, а также бактерии, попавшие в материал при его заборе и доставке. Популяционный состав микроорганизмов выражен и

гетерогенен, особенно при госпитальной инфекции, изменчив, и их качественный и количественный состав изменяется в процессе заболеваний, особенно при интенсивном использовании антибиотиков и антисептиков. Для рациональной антибиотикотерапии необходимо определять чувствительность культуры к антимикробным препаратам, провести типирование для определения источника инфекции и принадлежности к госпитальным экотарам. Учитывая возможность частой смены возбудителей и изменения их спектра чувствительности к антибиотикам, материал из открытых процессов необходимо исследовать через каждые 5-7 дней. В связи с выраженной внутри- и межпопуляционной изменчивостью условно-патогенных микробов, необходимо: резко увеличить выборку (числа исследуемых культур одного вида) в процессе диагностики; ориентироваться при выборе рациональных схем антибиотикотерапии на варианты и изоляты возбудителя, обладающие наиболее широким спектром и наиболее высоким уровнем устойчивости к антибиотикам и антисептикам; постоянно наблюдать за количественными и качественными изменениями в составе популяции микроорганизма возбудителей инфекционного процесса и своевременно корректировать лечение; для предупреждения суперинфекции необходима герметизация открытых раневых поверхностей (создание безмикробной среды) и резкое снижение их микробной контаминации на объектах внутрибольничной среды [181].

Несмотря на имеющиеся недостатки метода (относительная продолжительность исследований, при использовании сложных диагностических сред при культивировании требовательных микроорганизмов – высокая цена), его достоинства (высокая чувствительность и точность, возможность получения данных о количестве микробов в исследуемом материале и чувствительности к антимикробным препаратам) делают его основным в практике бактериологических лабораторий в настоящее время.

#### *7.1.1 Принципы микробиологической диагностики условно-патогенных микроорганизмов*

Основными задачами лабораторной диагностики в клинической микробиологии являются:

1. Выделение и идентификация возбудителя инфекционного заболевания у пациента до вида (при невозможности до рода) и, по-возможности, определение способности возбудителя формировать биопленку.
2. Определение спектра чувствительности выделенного микроорганизма, а также, по-возможности, биопленки к антимикробным препаратам.
3. Разработка рациональной антимикробной терапии на основе результатов лабораторного анализа.

Диагностические исследования, проводимые при заболеваниях, вызванных микроорганизмами, можно представить в виде:

1. Выделение микроорганизма возбудителя инфекционного процесса из исследуемого материала от пациента, определение его способности формировать биопленку.
2. Определение спектра чувствительности выделенного микроорганизма (биопленки при ее формировании) к клинически важным антибиотикам и антисептикам.
3. Определение сенсибилизации к аллергенам микроорганизмов (наиболее часто используют *in vivo* кожно-аллергические пробы и *in vitro* РБТЛ).
4. Выявление антител в сыворотке крови пациентов (как правило, необходимо выявить нарастание титра специфических антител более чем в 2 раза, для чего исследуют парные сыворотки, взятые с интервалом).
5. Данные неспецифических клинических анализов, указывающих на наличие инфекции, могут помочь в установлении природы инфекционного заболевания.

#### 7.1.2 Общие правила забора, хранения и пересылки материала

Результаты диагностики многих инфекционных заболеваний человека во многом зависят от правильного забора материала и соблюдения правил доставки, хранения и обработки [182].

Микроорганизмы чувствительны ко многим факторам окружающей среды (температура, влажность, а также антисептические средства и т.п.). В связи с этим с собранным материалом надо обращаться так, чтобы в максимальной степени обеспечить сохранение жизнеспособности возбудителей, находящихся в нем. В соответствии с рекомендациями ВОЗ ниже приведены правила забора, хранения и доставки материала в лабораторию, а также оценка полученных результатов. Помочь в интерпретации полученных данных могут также представления о нормальной микрофлоре соответствующих биотопов.

Правила забора, хранения и доставки материала в лабораторию:

1. Вид исследуемого материала должен определяться клинической картиной заболевания и соответствовать локализации и характеру инфекционного процесса. В случае неясности клинической картины, а также при отсутствии очаговой симптоматики для исследования берут кровь, а в некоторых случаях мочу.
2. Всегда собирают достаточное количество материала для детального тщательного исследования (например, при исследовании крови берут не менее 10 мл крови).
3. Материал для бакисследования должен забираться по возможности в начальном периоде болезни (возбудитель выделяется достоверно чаще, и инфекционный процесс имеет типичную локализацию). При хирургической инфекции, следовательно, материал

забирают до вскрытия абсцесса, флегмоны, первичной обработки раны, оперативного лечения.

4. Забор материала должен проводиться по возможности до применения антибиотиков и антисептиков. Если такая терапия начата, то теоретически ее следует прервать на 1-2 дня, а потом производить забор материала. Последнее возможно только в критических случаях, при отсутствии эффекта антибактериальных средств. Поэтому без отмены антибактериальной терапии нужно критически относиться к отрицательным результатам бакисследования. Следовательно, рекомендуется в таких случаях проводить забор материала до очередного введения (приема) антимикробного препарата.

5. Для того, чтобы избежать ошибок в определении этиологии заболевания, необходимо предупредить возможную контаминацию исследуемого материала нормальной микрофлорой пациента и микроорганизмами из окружающей среды. Поэтому забор надо осуществлять в строго асептических условиях. В начале материал следует максимально освободить от нормальной микрофлоры (например, прополоскать полость рта стерильным раствором без антисептиков; при раневой инфекции очистить поверхность раны и др.).

6. Многие микроорганизмы чувствительны к попаданию в материал антимикробных препаратов, поэтому необходимо исключить контакт с металлами и ватой, особенно искусственной, содержащей свободные жирные кислоты.

7. Материал, полученный от пациента, всегда должен расцениваться как потенциально опасный (ВИЧ, гепатиты и др.). Следовательно, при его заборе, хранении, доставке, обработке, во избежание заражения следует придерживаться мер техники безопасности для бактериологической и вирусологической лаборатории.

8. Материал необходимо доставить в возможно более короткий срок в лабораторию и начать исследование. При отсутствии возможности быстро доставить его в лабораторию, материал помещают в холодильник при  $t=4^{\circ}\text{C}$  или добавляют консервант, но лучше использовать вариант со специальными транспортными средами.

9. Материал, доставляемый в лабораторию для исследования, должен иметь направление, в котором указаны название лечебного учреждения, фамилия, имя, отчество, возраст, адрес пациента, дата заболевания, вид клинического материала, день и час его взятия, предполагаемый клинический диагноз, цель и метод исследования. Направление обязательно должен подписывать лечащий врач.

10. Для сохранности материала в процессе доставки следует оберегать его от действия факторов окружающей среды, таких как: свет, тепло, холод, механические повреждения и др. Поэтому пробы лучше доставлять в специальных металлических контейнерах с курьером.

11. После окончания бактериологических и вирусологических исследований остатки материала считаются опасными и подлежат

уничтожению (например, автоклавированием или сжиганием), предметы многоразового использования обеззараживаются.

Забор раневого отделяемого.

Удаляют отделяемое раны из поверхностных слоев. Забор материала производят из глубоких участков и/или краев раны с помощью стерильного тампона. Последний помещают в транспортную среду или производят прямой посев на питательные среды. Рекомендации: материал доставляют в лабораторию для немедленного посева  $\leq 1$  час; при отсроченной транспортировке необходимо избегать охлаждения материала; после посева на транспортную среду материал можно хранить при 4°C до 24 часов. Оценка количества микроорганизмов в раневом отделяемом важна для прогнозирования течения процесса. При обсемененности  $< 10^5$  КОЕ/мл микроорганизмов исследуемого материала (для грибов и анаэробов  $> 10^3$  КОЕ/мл) наблюдают хорошее заживление раны, а  $> 10^5$  КОЕ/мл нагноение развивается даже в жизнеспособных тканях. В случае наличия в ране некротизированных тканей, гематом, инородных тел развитие гнойного процесса возможно и при более низких уровнях обсемененности. Кроме того, при уровнях обсемененности раны  $> 10^5$  КОЕ/мл резко возрастает угроза развития сепсиса. В тоже время во время проведения антимикробной терапии наблюдается снижение микробной обсеменённости, что необходимо учитывать при этиологической диагностике. При одновременном обнаружении в материале нескольких видов микроорганизмов ведущее значение следует придавать видам, обнаруженным в наибольшем количестве.

Забор материала при абсцессах.

Материал для исследования – гной. После дезинфекции кожи необходимо произвести пункцию абсцесса стерильной иглой. Следует: аспират немедленно доставить в лабораторию в шприце; аспират 1-2 мл поместить во флакон со стерильной транспортной средой для анаэробов. В полученном из абсцессов гное наиболее часто присутствуют микроорганизмы только одного вида. Весьма часто (примерно в 20-60% случаев) присутствует анаэробная микрофлора, которая часто образует биопленку. При заборе материала из самопроизвольно вскрывшегося абсцесса или вскрытого хирургическим путем за возбудителей инфекционного процесса могут быть приняты представители нормальной микрофлоры кожи, что требует повторного посева для уточнения этиологии.

Забор мочи с помощью катетера.

Стерильный катетер вводят в мочевой пузырь и среднюю порцию мочи забирают в стерильную ёмкость. При наличии постоянного катетера необходимо произвести его дезинфекцию. Забор мочи проводят, пунктируя проксимальную часть катетера. Определить уровень локализации инфекции (в мочевом пузыре или почках) можно после удаления мочи из мочевого пузыря с помощью катетера и промывания его раствором антибиотиков. Забор мочи производят трижды с интервалом в 10 минут. При локализации

инфекционного процесса в почках во всех трех пробах будут микроорганизмы, причем с каждой исследуемой пробой их количество будет возрастать. Моча остается стерильной при локализации инфекции в мочевом пузыре.

Спинномозговая жидкость.

В месте люмбальной пункции с помощью стерильной иглы забирают спинномозговую жидкость в 2-3 стерильные пробирки с завинчивающейся крышкой по 2-5 мл в каждую, строго соблюдая принципы асептики как и при заборе крови. Во избежание охлаждения пробирок их следует завернуть в толстый слой ваты.

Мокрота.

Мокроту (желательно без слюны) собирают из нижних отделов дыхательных путей. Перед откашливанием больной чистит зубы и полощет рот кипяченой водой. Утреннюю мокроту, выделяющуюся во время приступа кашля, собирают в стерильную банку с крышкой или в специальный контейнер. Правильно собранная мокрота является гнойной или слизисто-гнойной, с прожилками крови (иногда также – с зелеными включениями). Также может браться содержимое бронхов (лаваж), щёточные соскобы (brushings).

Кровь.

Соблюдая стерильность, из кубитальной вены берут 10-20 мл крови желательно в начале озноба у лихорадящих пациентов (исследование артериальной крови в большинстве случаев не имеет преимуществ по сравнению с венозной). Существует несколько вариантов забора крови.

- забирается две пробы из вен разных рук с интервалом 30 минут,
- забор трехкратно из одной руки в течение 24 часов,
- забор 5-6 раз в течение 48 часов.

Кожу перед венопункцией необходимо обработать 96% этиловым спиртом и раствором йода. При этом дезинфектант должен испариться с кожи до взятия пробы. Следует отметить, что даже после тщательной обработки кожных покровов в глубоких слоях кожи могут остаться *S.epidermidis*, *Propionibacterium acnes* и др., которые впоследствии могут попасть в образцы крови (псевдобактериемия). Псевдобактериемия может также встречаться при контаминации антисептических растворов, шприцев или игл, используемых при взятии анализа крови. При проведении венопункции используют стерильные перчатки, иглу и шприц. Большую часть взятой крови 10-20 мл (у детей > 2 мл) засевают в 150-200 мл богатой питательной среды в соотношении 1:10 (делается для того, чтобы путем разведения крови преодолеть естественные бактерицидные свойства крови); 1-2 мл крови вносят в пробирку с 1,0 мл цитрата натрия. Для нейтрализации антибактериальных факторов крови, включая комплемент, рекомендуется по возможности применять 0,025-0,03% полианитолсульфонат натрия. Следует отметить, что увеличение объема засеваемой крови в значительной мере увеличивает вероятность получения положительного результата. Показано, что увеличение объема засеваемой

крови на 1 мл повышает вероятность обнаружения микроорганизмов на 3%. Перед проколом иглой необходимо обработать резиновую крышку флакона спиртом. Количество образцов крови и время ее исследования зависят от характера заболевания. У лихорадящих пациентов рекомендуется брать кровь до начала озноба, что увеличивает частоту выделения возбудителя. Пробы крови для анализа на анаэробную флору лучше отбирать в вакуумные флаконы со специальной средой для анаэробов [182]. Условием успешной диагностики является быстрая доставка взятых образцов крови в лабораторию (при невозможности немедленной транспортировки следует избегать охлаждения проб и инкубировать их при  $t=37^{\circ}\text{C}$ ).

### *7.1.3 Питательные среды для культивирования микроорганизмов*

Классификация питательных сред:

А. По происхождению:

1. естественные, т.к. их готовят из натуральных продуктов питания (мясо, рыба, молоко, картофель);
2. искусственные – готовят специально для выращивания бактерий:
  - среды из естественных продуктов (мясная вода, мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА);
  - синтетические питательные среды (используют строго определенное количество солей, аминокислот, азотистых оснований, витаминов и других компонентов).

Б. По назначению:

1. общего назначения (МПБ, МПА) – для выращивания большинства бактерий;
2. селективные – используют специальные добавки (антибиотики, антисептики и т.п.), которые избирательно подавляют рост микроорганизмов (например, NaCl в больших концентрациях угнетает рост всех кокков, кроме стафилококков, на молочно-солевом агаре);
3. элективные – содержат специальные добавки, которые избирательно способствуют росту одного вида микробов из смеси;
4. дифференциально-диагностические – позволяют дифференцировать по изменениям на среде один вид бактерий от других по одному или целому ряду признаков (например, на среде Эндо микробы, расщепляющие лактозу, образуют колонии красного цвета, не разлагающие – прозрачные).

В. По консистенции:

1. жидкие;
2. полужидкие получают при добавлении агар-агара в концентрации 0,5-0,8%;
3. плотные содержат выше 1% бактериологического агара.

В зависимости от цели использования по назначению также выделяют среды: обогащения, накопления чистой культуры, для получения изолированных колоний.



Незрелые БП можно культивировать на стандартных питательных средах. Большее значение имеет поверхность, на которой формируется сообщество (стекло, полиэтилен, металл и др.) Зрелые микробные биопленки можно получить в динамических моделях [183].

## 7.2 Методы культивирования микробных биопленок

### 7.2.1 Формирование биоплёнки на покровном стекле

Для формирования биопленки на покровном стекле предложено многоразовое, простое, удобное для использования, а также пригодное для стерилизации отдельных его компонентов устройство.

Для дальнейшего окрашивания и изучения биоплёнки необходимо, чтобы БП формировалась на покровном стекле в пределах определённых границ. Необходимо, чтобы края и обратная сторона покровного стекла оставались чистыми для удобного перемещения и выполнения следующих этапов исследования.

Все перечисленные цели могут быть достигнуты с помощью устройства для выращивания БП, представленного на рисунке 7.1. На рисунке 7.1 изображено устройство в разобранном виде, где 1 – цельная пластина из нержавеющей стали, 2 – латексная пластина, 3 – покровные стекла, 4 – пластина из нержавеющей стали с отверстиями.

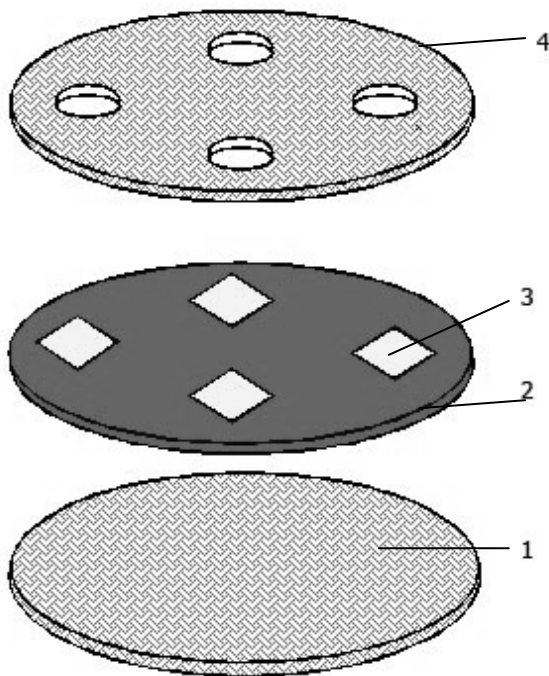


Рисунок 7. 1 – Устройство для выращивания биоплёнок

Устройство для выращивания БП состоит из двух круглых пластин из нержавеющей стали диаметром 7 см и толщиной 0,5 мм (1, 4 на рисунке 7.1; 1, 4 на рисунке 7.2). Данный материал является доступным,

многоразовым, удобен для стерилизации в бактериологической лаборатории. Между пластинами располагается цельная латексная пластина толщиной 0,2 мм (3 на рисунке 7.1, 3 на рисунке 7.2), обеспечивающая плотное прилегание стальных пластин друг к другу. На латексной пластине без отверстий (4 на рисунке 7.1) располагаются 4 стекла размером 18х18 мм, толщиной 0,1 мм (2 на рисунке 7.1, 2 на рисунке 7.2), на которых формируется микробная БП. Применение стёкол указанных универсальных размеров позволяет использовать один метод формирования БП для различных методов исследования. Одна из пластин из нержавеющей стали, которая располагается над стёклами, имеет 4 круглых отверстия диаметром 14 мм, равноудаленных от центра (4 на рисунке 1, 4 на рисунке 7.2), что позволяет получать одинаковые по своим характеристикам биопленки на всех 4 покровных стеклах. Устройство фиксируют по окружности пластмассовыми канцелярскими скрепками. На рисунке 7.2 изображено устройство в собранном виде.

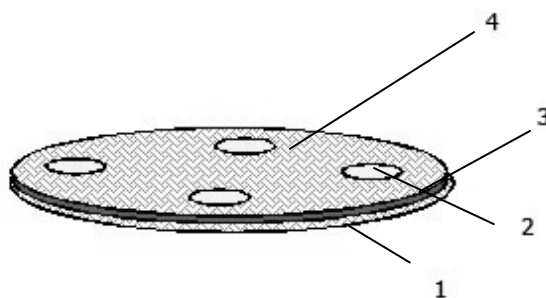


Рисунок 7.2 – Устройство для выращивания биоплёнок

Для непосредственного формирования биоплёнки необходима инкубация устройства в бульоне с микроорганизмами. Для этого устройство помещают в стерильную стеклянную чашку Петри отверстиями кверху. Перед инкубацией необходимо приготовить взвесь микроорганизмов в стандартной концентрации  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. Соответственно, готовят взвесь бактерий в бульоне Мюллера-Хинтона, оптическую плотность доводят на денситометре до 0,5  $E_{оп}$ , либо сравнивают с оптическим стандартом. Затем в чашку Петри с устройством вносят 1 мл микробной взвеси и 10 мл бульона Мюллера-Хинтона, инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 24 часов. После инкубации устройство необходимо осторожно извлечь из чашки Петри. Для дальнейшей работы со сформированной на стёклах биоплёнкой необходимо высушить устройство при комнатной температуре и отделить покровные стекла от металлических пластин. В результате получается сформированная микробная биопленка, фиксированная к покровному стеклу с одной стороны в границах отверстий верхней пластины из нержавеющей стали.

Применение предлагаемого устройства позволяет стандартизировать методику формирования БП на покровных стеклах и сделать ее удобной в применении, так как позволяет изучать БП практически сразу после извлечения конструкции из чашки Петри с микроорганизмами [183].

### 7.2.2 Формирование биопленок в полистироловом планшете

Для количественного изучения биоплёнок на основании данных литературы опытным путём был выбран 96-луночный плоскодонный полистироловый планшет, как наиболее удобный и доступный. Возможность постановки эксперимента сразу в нескольких лунках позволяет одновременно исследовать несколько изолятов микроорганизмов. Материал, из которого сделан планшет, нетоксичен и широко используется для культивирования клеточных культур в бактериологических и иммунологических лабораториях. Для удобства дальнейшего изучения БП необходимо её формировать в планшете с плоским дном лунок, так как плоское дно планшета в наибольшей степени подходит для последующего измерения оптической плотности.

Для формирования БП необходимо инкубировать взвесь микроорганизмов в полистироловом планшете при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 24 часов. Предложено использовать взвесь микроорганизмов в бульоне Мюллера-Хинтона со стандартной концентрацией 1,5\*10<sup>8</sup> КОЕ/мл. Взвесь микроорганизмов с конечной концентрацией 1,5\*10<sup>8</sup> КОЕ/мл инокулируется в лунки плоскодонного полистиролового планшета в количестве 150 мкл. На один изолят рекомендуется использовать 12 лунок ряда планшета, что позволяет получить статистически достоверные данные для каждого исследуемого изолята. Кроме того, такой вариант позволяет проводить изучение сразу 6 изолятов на одном планшете. Отрицательным контролем служат лунки с 150 мкл бульона Мюллера-Хинтона без бактерий. В качестве положительного контроля используются штаммы с известной способностью формировать БП, например, *S.aureus* ATCC 6538, *P.aeruginosa* ATCC 9027 и др.

После инкубации планктонные формы бактерий необходимо удалить. Данную процедуру можно выполнить вручную, однако для повышения воспроизводимости результатов следует использовать автоматические мойки для иммунологических планшетов, например, МВ-350 производства «Технофорум». Для более эффективного удаления планктонных форм в лунки планшета с помощью автоматической мойки необходимо добавить по 100 мкл дистиллированной воды, а затем четырехкратно промыть, используя 150 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл. Таким образом, все планктонные формы бактерий из лунки будут удалены, и в ней останется только сформированная биопленка [184].

### *7.2.3 Формирование биоплёнки на поликарбонатной мембране, мембране из инертного полимера*

С целью исследования массы сформированной биоплёнки, а так же работы с матриксом биоплёнки предложена следующая методика. Для формирования биоплёнки на поликарбонатной мембране необходимо приготовить взвесь микроорганизмов в бульоне Мюллера-Хинтона с плотностью  $0,5 \text{ Е}_{\text{оп}}$ , определенной с помощью денситометра, что соответствует концентрации микроорганизма  $1,5 \cdot 10^8 \text{ КОЕ/мл}$ . На агар в чашку Петри поместить предварительно взвешенную поликарбонатную мембрану с диаметром пор  $0,3\text{-}0,45 \text{ мкм}$ , на поверхность которой добавлено  $700 \text{ мкл}$  взвеси микроорганизмов. Отрицательным контролем служит взвешенная поликарбонатная мембрана, на поверхность которой добавлено  $700 \text{ мкл}$  бульона без микробов. Чашки Петри с поликарбонатной мембраной необходимо инкубировать в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 часов.

Для рутинного выращивания БП на мембране можно использовать вместо поликарбонатной мембрану из инертного полимера, как более дешёвую и доступную. Для формирования биопленки необходимо инкубировать взвесь микроорганизмов в  $0,9\%$  растворе NaCl в чашке Петри на мембране. Для этого в стерильную чашку Петри с агаром Мюллера-Хинтона помещают стерильную мембрану, прижимают стеклянным грузом и вносят  $0,5 \text{ мл}$  взвеси бактерий в стандартной концентрации  $1,5 \cdot 10^8 \text{ КОЕ/мл}$  и  $5 \text{ мл } 0,9\% \text{ NaCl}$ . Чашку Петри инкубируют в течение 3 суток при температуре  $37^\circ\text{C}$ .

### **7.3 Микроскопический (бактериоскопический) метод**

Метод основан на изучении способности микроорганизмов (бактерий, простейших и грибов) окрашиваться простыми и сложными красителями. К его достоинствам относятся доступность, относительно не высокая стоимость, простота исполнения, высокая скорость получения результата и безопасность. В то же время он мало чувствителен и позволяет определять бактерии при условии содержания их в исследуемом материале  $10^4\text{-}10^5$  и более микроорганизмов на  $1 \text{ г}$  или  $1 \text{ мл}$ . Из-за сходства морфологии большинства бактерий метод позволяет идентифицировать культуру только в рамках крупных таксонов: грам(+) или грам(-) бактерий, кокков (стафилококки, стрептококки и т.д.), спирохет и др. В то же время при идентификации многих видов грибов и простейших диагностические возможности метода микроскопии более широкие и позволяют проводить видовую идентификацию. Кроме идентификации по морфологическим и тинкториальным свойствам микроорганизмов, метод используется для определения чистоты выделенной культуры [185, 186, 187] и является ориентиром при проведении бактериологического метода (выбор питательных сред и методики посева).

Применение ИФА, проточной цитометрии бактерий и иммунофлуоресцентного метода увеличило возможности использования микроскопии. Однако, по-прежнему, в большинстве случаев не может заменить бактериологический, т.к. не позволяет определить чувствительность бактерий к антимикробным препаратам, определить факторы патогенности, установить принадлежность к госпитальным эковамам [188].

Наиболее часто в бактериологических лабораториях используют такие микроскопические препараты: бактериологический мазок (препарат-мазок), тонкий мазок, препарат-отпечаток, «придавленная капля», «толстая капля» и «висячая капля» [189].

### *7.3.1 Индикация и исследование биоплёнок с помощью световой микроскопии*

Одним из вариантов индикации биоплёнки на покровном стекле с помощью световой микроскопии является метод с окраской матрикса биоплёнки. Одним из доступных и специфических красителей является конго красный. Данный краситель связывается с полисахаридным матриксом микробных БП. Таким образом, для индикации микробных сообществ с помощью световой микроскопии необходимо сформировать биоплёнку на покровном стекле с помощью устройства для формирования биоплёнок, как описано выше. Затем покровное стекло фиксировать к предметному стеклу бесцветным лаком. Далее препарат обрабатывают аэрозольным фиксатором и высушивают в течение 20-30 мин. Биоплёнку окрашивают в течение 15 мин смесью насыщенного водного раствора конго красного с добавлением 10% Твин 80. Твин 80 является поверхностно-активным веществом и способствует более быстрому проникновению красителя сквозь матрикс БП. После инкубации препарат промывают проточной водой и высушивают.

Для контрастирования бактериальных клеток в составе биоплёнки препарат окрашивают в течение 6 мин 10% карболовым фуксином, затем повторно промывают проточной водой и высушивают. Изображение фиксируют на световом микроскопе под иммерсионным объективом при увеличении x100 при помощи цифровой фотокамеры Leica DFC 295. При этом клетки бактерий в результате окрашивания карболовым фуксином имеют насыщенный пурпурно-красный цвет, а экзополисахаридный матрикс, окрашенный конго красным – оранжево-розовый.

На рисунке 7.3 изображена сформированная на покровном стекле бактериальная биоплёнка. Бактериальные клетки окрашены карболовым фуксином в насыщенный пурпурно-красный цвет (1 на рисунке 7.3), а экзополисахаридный матрикс окрашен конго красным в оранжево-розовый цвет (2 на рисунке 7.3). На рисунке 4 биоплёнка не была сформирована, бактериальные клетки окрашены карболовым фуксином в насыщенный пурпурно-красный цвет (1 на рисунке 7.4), а оранжево-розового окрашивания матрикса БП нет.



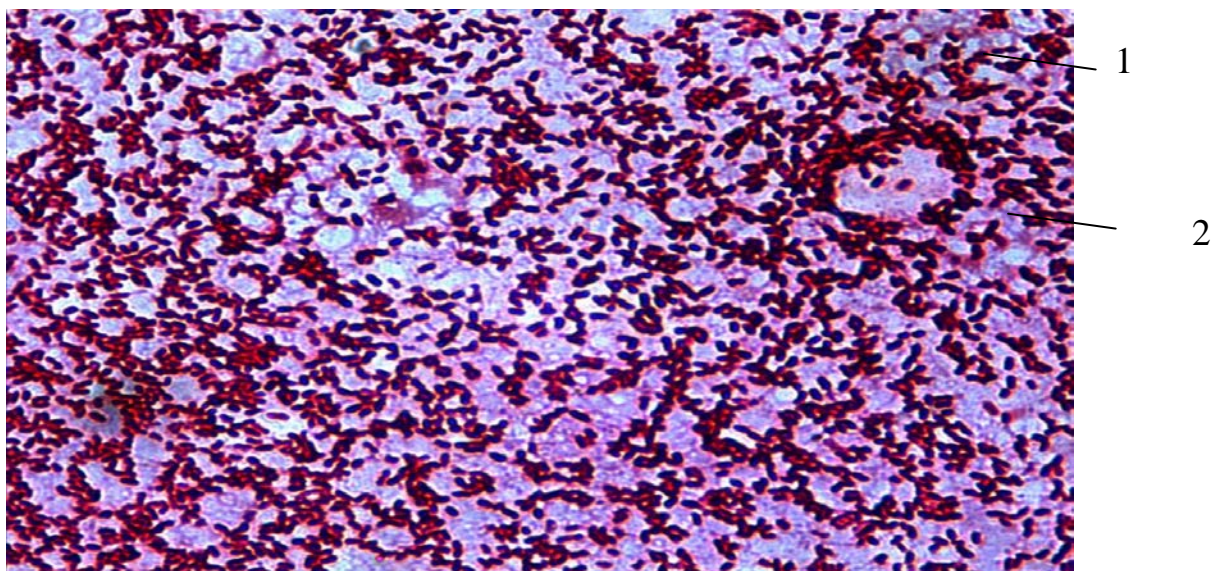


Рисунок 7.3 – Бактериальная биоплёнка *P.aeruginosa*  
(увеличение x100, световой микроскоп Leica DFC 295)

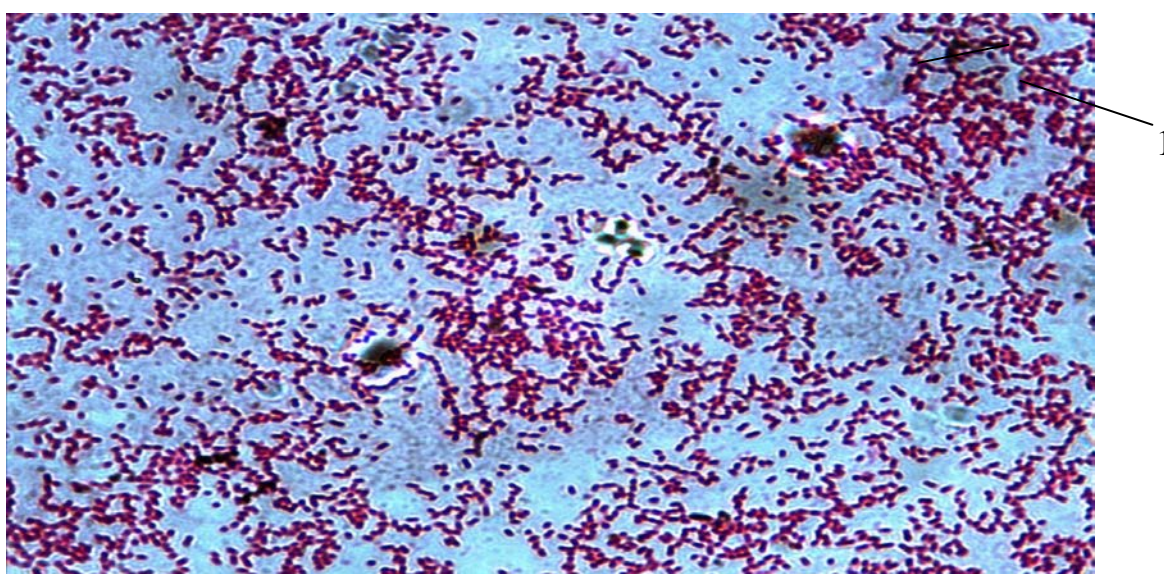


Рисунок 7.4 – Планктонные формы *P.aeruginosa*  
(увеличение x100, световой микроскоп Leica DFC 295)

Одной из характеристик, отражающих степень зрелости биоплёнки, является её толщина. Под объектив 100 без иммерсии светового микроскопа Leica DFC 295 при увеличении x1000 устанавливают камеру Горяева, заполненную красителем конго красным. Определяют точки фокусировки сверху и снизу, отмечая при этом показатели на микровинте микроскопа. Вычисляют разность между высшей и низшей точками фокусировки. При использовании иммерсионного объектива необходимо учитывать индекс рефракции (1,33). Вычисляют цену деления микровинта по высоте камеры Горяева, равную 0,1 мм. После того, как микроскоп подготовлен, под объектив помещают препарат окрашенной БП. Определяют точки фокусировки сверху и снизу, отмечая при этом

показатели на микровинте микроскопа. Умножают цену деления на разность точек фокусировки препарата и определяют толщину биопленки.

Таким образом, описанные методы исследования биоплёнки с помощью световой микроскопии просты и доступны для рутинного использования [190].

### *7.3.2 Индикация и исследование биоплёнок с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии*

Наиболее высокотехнологичным и точным методом исследования микробных биоплёнок является конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Данный вид микроскопии представляет наиболее реалистичную трёхмерную структуру матрикса БП, так как подготовка к исследованию не требует полного удаления воды, которая может составлять до 80% объёма матрикса [191].

Для исследования микробных сообществ с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии формируют биоплёнку на покровном стекле с помощью устройства для формирования БП, как описано выше. Для удобства работы с покровным стеклом его фиксируют к предметному стеклу бесцветным лаком.

Для конфокальной лазерной сканирующей микроскопии используют микроскоп Leica TCS SPE с программным обеспечением LAS AF. Окраску препаратов проводят 1% спирто-феноловым раствором ауромина или насыщенным водным раствором конго красного, или 0,5% водным раствором конъюгированного флуоресцентного красителя к полисахаридам, либо изучают аутофлуоресценцию без окраски. При окраске ауромином для сканирования препаратов используют: возбуждающий лазер – 488 нм, область детекции – 500-600 нм; при окраске конго красным: возбуждающий лазер – 532 нм, область детекции – 550-600 нм; при окраске конъюгированным флуоресцентным красителем к полисахаридам: возбуждающий лазер – 532 нм, область детекции – 600-700 нм; при использовании аутофлуоресценции: возбуждающий лазер – 405 нм, область детекции – 400-650 нм. Сканирование производят на всю толщину препарата с шагом 0,5 мкм, площадь сканирования 0,013 мм<sup>2</sup>, с разрешением микроскопа в горизонтальной плоскости 150 нм. Толщину биоплёнки определяют, как расстояние между границами флуоресценции по оси Z.

### *7.3.3 Индикация и исследование биоплёнок с помощью электронной микроскопии*

Электронная микроскопия включает в себя трансмиссионную микроскопию, а также сканирующую микроскопию. Этот метод позволяет изучать в частности структуру бактерий и их внеклеточных компонентов. С использованием трансмиссионной электронной микроскопии выявлены некоторые макромолекулы. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) основана на использовании предварительно сформированного

тонкого электронного луча. Последние достижения в данной области связаны с возникновением принципиально нового метода микроскопических исследований – сканирующей зондовой микроскопии, позволяющей выполнять исследование рельефа поверхности объекта и его физических свойств с высоким пространственным разрешением [192].

Основополагающим в электронной микроскопии является приготовление образца, который должен быть твердым, контрастным, прозрачным для прохождения электронов, сухим, устойчивым к высокому вакууму и электромагнитному излучению. Кроме того, образец должен быть очень тонким (не более 100 нм), чтобы пучок электронов мог пройти сквозь него. Принцип подготовки образца биопленки для изучения с помощью электронной микроскопии: фиксация (захватить объект на нужной стадии в его нативном состоянии), дегидратация – замещение воды органическими растворителями (этиловым спиртом, ацетоном), заключение в смолу (пропитка материала эпоксидной смолой для придания ему твердости для облегчения нарезки срезов), получение ультратонких срезов образца, полупрозрачных для пучка электронов, окраска срезов солями тяжелых металлов, такими как свинец, уран, непрозрачными для пучка электронов, с целью получения контрастного изображения [193].

Наиболее распространенным методом подготовки образца для сканирующей электронной микроскопии является химическая фиксация с последующим высушиванием в критической точке. Образец фиксируют, затем помещают в раствор этанола, после этого переносят в жидкий  $\text{CO}_2$  под давление в специальный прибор и медленно нагревают. Давление поднимается. Когда давление и температура ( $31^\circ\text{C}$  и 74 бара) вместе проходят «критическую точку», давление уменьшают. Таким образом, образец высушивается без каких-либо повреждений, минуя фазовый переход жидкость-газ. Далее образец напыляют тонким (от 1 нм) слоем металла, например, платины, палладия или вольфрама, чтобы усилить проводимость и добавить механической прочности образцу, а также локализовать сигнал на поверхности образца [193].

Науменко З.С. и Очеретина Р.Ф. предложили для подготовки образцов биопленок микроорганизмов перед исследованием методом сканирующей электронной микроскопии культивировать микроорганизмы на поверхности ячейки диаметром 3 мм ячейковой упаковки с перфорациями (проколы сверху вниз) по всему диаметру ячейки. Далее ячейку погружают в суспензию микроорганизмов в питательной среде. После культивирования бактерий в условиях, соответствующих поставленной задаче, образец с микроорганизмами фиксируют в течение 24 часов в смеси растворов параформальдегида и глutarальдегида на фосфатном буфере, pH 7,4, при температуре  $4^\circ\text{C}$ . Затем их промывают в фосфатном буфере 20 минут (4 раза по 5 мин), в дистиллированной воде 6 минут (3 раза по 2 мин). Затем обезвоживают поэтапно в 70% 15 минут (3 раза по 5 мин) и по 10 минут в 80% (2 раза по 5 мин), 96% (2 раза по 5 мин), 100% (2 раза по 5 мин) этиловом спирте. Пропитывают в камфене



(C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) при температуре 60°C в течение 20 минут (2 раза по 10 мин). Далее образцы высушивают на воздухе до полной возгонки камфена при комнатной температуре. Затем осуществляют монтаж ячейки на держатель образца для сканирующего электронного микроскопа и исследуют [194].

#### *7.3.4 Индикация и исследование биоплёнок с помощью атомно-силовой микроскопии*

В настоящее время непрерывно совершенствуются варианты исследования биопленок с использованием современных методов визуализации. Одним из способов микроскопии, который позволяет изучать биологические ультраструктуры, является атомно-силовая микроскопия (АСМ). Важным преимуществом АСМ является нетребовательность к электропроводности исследуемых объектов. В основу АСМ заложена регистрация межатомного взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и наноразмерным острием кантилевера. Кроме того, методы АСМ в отличие от электронной микроскопии не требуют длительной подготовки образца к исследованию, этапов окрашивания, но дают возможность изучать трехмерную геометрию поверхности исследуемого объекта с нанометровым пространственным разрешением [195].

Процедура подготовки образцов для атомно-силовой микроскопии заключается в их иммобилизации на ровной подложке. Материал подложки можно варьировать в широких пределах в зависимости от поставленных задач. Традиционно в качестве субстрата используются атомно-гладкие подложки из слюды, графита и других слоистых материалов, а также стекла, полимерные материалы и металлические поверхности. Варьируя подложки, можно изучать адгезивные свойства бактерий на поверхности различных материалов.

Таким образом, основные преимущества АСМ при изучении бактериальных биопленок заключаются в возможности изучения реальной поверхности биопленки без применения специальных методов подготовки образцов (напыления металлами, приготовления реплик и пр.), в возможности проведения исследований нативной структуры на воздухе или в различных жидких средах, а также в высоком пространственном разрешении – доли нанометра в плоскости образца и сотые доли нанометра по нормали к образцу [196].

#### **7.4 Индикация и количественное определение образования биоплёнки в полистироловом планшете**

##### *7.4.1 Индикация и количественное определение образования биоплёнки в полистироловом планшете с помощью красителя кристаллического фиолетового*

Индикация биопленки с использованием раствора кристаллического фиолетового основана на окраске бактериальных клеток и матрикса БП.

Соответственно, необходимо фиксировать БП, сформированную в полистироловом планшете, путем добавления в лунки по 160 мкл 2,5 % раствора глютаральдегида (экспозиция в течение 5 минут). Затем раствор глютаральдегида четырехкратно отмывается с помощью автоматической мойки, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл. Затем для окраски БП в лунки планшета необходимо внести по 180 мкл 0,25 % раствора кристаллического фиолетового на 5 минут, после чего планшет снова необходимо четырехкратно промыть, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл, и высушить в течение 10 минут. Для экстракции раствора красителя из клеток в лунки добавляют по 200 мкл 33 % раствор уксусной кислоты, экспозиция при комнатной температуре 10 минут. Для определения оптической плотности планшет помещают в многоканальный спектрофотометр, где при длине волны 620 нм измеряют ОП в лунках. Чтобы определить способность изолята формировать биоплёнку, необходимо определить минимальное значение оптической плотности БП для лунок с микроорганизмами, образующими биоплёнку по формуле:

$$\text{ОПБ} = \text{М (ОП лунок контроля)} + 3 \times \sigma (\text{ОП лунок контроля})$$

По полученным на спектрофотометре данным необходимо рассчитать среднее значение оптической плотности двенадцати опытных лунок [197]. По таблице 7.1 определить полуколичественно способность микроорганизма формировать БП.

Таблица 7. 1 – Способность микроорганизмов формировать биопленку

Способность микроорганизма формировать биоплёнку	Оптическая плотность
Отсутствует	$\text{ОП} \leq \text{ОПБ}$
Низкая	$\text{ОПБ} < \text{ОП} \leq 2 \times \text{ОПБ}$
Умеренная	$2 \times \text{ОПБ} < \text{ОП} \leq 4 \times \text{ОПБ}$
Высокая	$4 \times \text{ОПБ} < \text{ОП}$

Для пересчета единиц оптической плотности в вес микробной БП в мкг на одну лунку 96-луночного полистиролового плоскодонного планшета можно использовать формулу, которая получена путем сопоставления оптической плотности различной концентрации раствора кристаллического фиолетового, окрашенного матрикса с массой высушенной неокрашенной БП.

$$X = 226,28 * [E_{\text{оп пробы}} - E_{\text{оп контроля}}]^{1,2755},$$

где X – масса биопленки.

#### 7.4.2 Индикация и количественное определение образования биоплёнки в полистироловом планшете с помощью конго красного

Более специфичным методом индикации микробных сообществ является метод, основанный на окраске матрикса биоплёнки раствором конго красного. Для его осуществления необходимо к сформированной в

полистироловом планшете биопленке добавить по 180 мкл 1% водного раствора конго красного на 15 минут, после чего планшет необходимо четырехкратно промыть, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл, и высушить в течение 10 минут. Для экстракции красителя из матрикса биоплёнки в лунки добавить по 200 мкл 96% этилового спирта и инкубировать при комнатной температуре 15 минут. Для измерения оптической плотности планшет поместить в многоканальный спектрофотометр, где при длине волны 492 нм определить оптическую плотность в лунках. Чтобы определить, формирует ли изолят биоплёнку, необходимо определить минимальное значение оптической плотности для лунок с микроорганизмами, образующими биоплёнку по формуле:

$$\text{ОПБ} = \text{М (ОП лунок контроля)} + 3 \times \sigma (\text{ОП лунок контроля}).$$

По полученным на спектрофотометре данным определить среднее значение оптической плотности двенадцати опытных лунок. При значении ОП опытных лунок равной либо меньше ОПБ – считать микроорганизм не образующим БП; при значении ОП опытных лунок больше ОП – считать микроорганизм образующим БП [116].

### **7.5 Индикация и исследование биоплёнок с помощью флуориметрии**

Для индикации биопленки флуориметрически выделенные изоляты переносят на агар и инкубируют при 37<sup>0</sup>С в течение 24 часов. В асептических условиях с помощью бактериологической петли готовят взвесь на бульоне Мюллера-Хинтона с оптической плотностью 0,5 E<sub>оп</sub> (на денситометре или сравнивают со стандартом ОП 0,5 McFarland), что соответствует конечной концентрации 1,5x10<sup>8</sup>КОЕ/мл.

В лунки полистиролового планшета вносят по 150 мкл полученной взвеси бактерий, на один изолят отводят 12 лунок ряда. Отрицательным контролем служат лунки с 150 мкл стерильного бульона Мюллера-Хинтона. Герметично закрытый планшет инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 48 часов. Планшет четырёхкратно промывают с помощью автоматической мойки, используя 150 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл. Образовавшуюся БП фиксируют путём добавления в лунки по 160 мкл 2,5 % раствора глутаральдегида (экспозиция в течение 5 минут). Планшет четырехкратно промывают, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл, и вносят по 180 мкл в концентрации 4 мкг/мл раствора DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид) на 10 минут, после чего планшет снова четырехкратно промывают, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл, и высушивают в течение 10 минут. На следующем этапе в лунки добавляют по 200 мкл 96% раствора этилового спирта. Экспозиция при комнатной температуре составляет 15 минут. Содержимое всех лунок, относящихся к исследуемому изоляту, собирают, разводят в 4 раза

дистиллированной водой и помещают в кварцевую кювету. Измерения проводят, используя флуориметр, где при длине волны возбуждения  $\lambda_{ex}=358$  нм и длине волны эмиссии  $\lambda_{em}=461$  нм определяют оптическую плотность в кювете для каждого изолята.

Определение концентрации ДНК в матриксе биопленки (мкг/мл) производят на основании калибровочного графика или формуле, в которой отражена зависимость концентрации ДНК от ОП конечного раствора:

$$X_{(\text{мкг/мл})} = 0,44 + 5,93 \cdot E_{\text{оп}},$$

где X – искомый результат,

$E_{\text{оп}}$  – ОП пробы минус ОП контроля.



Для калибровки использован раствор ДНК в концентрации 1 мг/мл, меченный флуоресцентным красителем DAPI.

С целью оценки метода был проведен корреляционный анализ со стандартным методом индикации биопленки спектрофотометрически с использованием в качестве красителя генцианвиолета ( $r=0,97$ ,  $p<0,05$ ).

## 7.6 Индикация и количественное определение биоплёнки на поликарбонатной мембране

Индикацию биоплёнки в данном случае проводят по изменению массы поликарбонатной мембраны. Для этого определяют среднее значение изменения массы поликарбонатной мембраны в контроле (ИМК). Определяют среднее значение изменения массы поликарбонатной мембраны в опыте (ИМО). Рассчитывают значение сформированной биомассы биоплёнки (ББП) на единице площади за сутки:

$$\text{ББП} = (\text{ИМО} - \text{ИМК}) / S / n,$$

где S – площадь поликарбонатного диска,

n – количество суток инкубации.

Опытным путём определено, что при значении ББП  $\geq 1,8$  мг/см<sup>2</sup>/сутки микроорганизм следует считать образующим биоплёнку.

## 7.7 Методы генетического анализа микроорганизмов

Генетический анализ в основном основан на знании об организации генома микроорганизмов. Анализ последовательности нуклеотидов в ДНК имеет лишь вспомогательное значение. Методы генетического анализа позволяют составить полные карты генетической последовательности ДНК в хромосомах. Внедренные в последнее время в лабораторную практику методы ДНК-гибридизации, ПЦР, несмотря на большую специфичность и высокую чувствительность (около 10 микроорганизмов в мл или грамме исследуемого материала), обладают целым рядом недостатков, среди которых надо отметить более высокую стоимость одного определения, техническую и методическую сложность. Однако за генетическими методами, особенно ПЦР, будущее [198].

Плазмидный профиль чаще всего из-за относительной простоты методик используется для типирования микроорганизмов. После экстракции плазмидной ДНК и их разделения на основе молекулярного веса в агарозном геле, например, в электрофорезе, появляется возможность провести типирование бактерий по плазмидному профилю.

Метод молекулярной гибридизации – это один из самых точных методов генетического анализа, он высоко чувствителен и позволяет выявить до  $10^{-10}$  г/мл специфической нуклеиновой кислоты, но в то же время один из самых сложных [199].

Принцип методики молекулярной гибридизации основан на высокоспецифичном связывании (прочнее, чем антиген с антителом) взаимодействии и образовании комплементарных двунитчатых структур (ДНК-ДНК, ДНК-РНК и РНК-РНК).

Последовательность можно представить таким образом:

1. В начале разрушают исследуемые микроорганизмы, проводят деспирализацию ДНК с образованием одноцепочечных структур;
2. Далее проводят адсорбцию полученного материала на твердой фазе, например, на нитроцеллюлозной мембране;
3. После чего материал обрабатывают зондом, который представляет собой короткую последовательность нуклеиновой кислоты, полученной искусственно генно-инженерными методами. Он должен быть комплементарен специфичному участку нуклеиновой кислоты и иметь метку, например, радиоактивную. При наличии в ДНК микроорганизмов, комплементарных зонду участков, происходит их связывание (гибридизация). При этом не связавшиеся зонды удаляются промыванием;
4. Учет результатов проводят, если используют радиоактивную метку, с помощью автордиографии (пробы помещают в счетчик и учитывают радиоактивность пробы).

К наиболее распространенным вариантам молекулярной гибридизации относят блоттинг по Саузерну (*Southern blotting*, от англ. *blot* – пятно, отпечаток). В начале очищенную ДНК обрабатывают рестриктазами (эндонуклеазами). После образования фрагментов ДНК

проводят электрофорез. Разогнанные в электрофореze фрагменты переносят с агарозы на нитроцеллюлозные фильтры. После чего фильтры обрабатывают зондом и затем сравнивают положение искомого гена на фильтре с контролем. Для изучения РНК применяется альтернативный способ, который получил название *Northern blotting* – «северный блоттинг».

Существует также вариант гибридизации *in situ*, который позволяет выявлять специфические фрагменты ДНК и РНК в клетках и, соответственно, определять функциональную активность по числу копий генов. С этой целью применяют замороженные срезы ткани, а также изучают другие клеточные структуры [200].

Методы определения первичной последовательности нуклеиновых кислот (секвенирование). Наиболее распространенным методом секвенирования является метод Максама и Гилберта. ДНК переводят в одонитчатую форму и метят с одного конца радиоактивной меткой. С помощью ферментов-рестриктаз (эндонуклеаз) разрезают ДНК по определенным коротким последовательностям. Как правило, используют четыре набора рестриктаз, которые оставляют на конце одно из оснований: аденин, тимин, гуанин или цитозин. После чего проводят электрофорез в агарозе, затем гель накладывают на рентгеновскую пленку и экспонируют. Последовательность исходного фрагмента ДНК определяют, сопоставляя треки между собой.

Полимеразная цепная реакция основана на многократном копировании (по крайней мере, в  $10^5$  раз) целевого фрагмента ДНК ферментом ДНК-полимеразой. Фермент может достраивать короткий участок ДНК, называемый праймером, который обязательно образовал комплекс с другой цепью ДНК. Комплекс образуется при соответствии (комплементарности) первичной последовательности праймера фрагменту ДНК из материала. Фермент способен достраивать праймер только в одном направлении. Биосинтез осуществляют в специальных физико-химических условиях. Суть способа заключается в следующем: исследуемый материал, содержащий 2-х-спиральную нуклеиновую кислоту (ДНК), нагревают до 90-100°C, вызывая тем самым расхождение 2-х-цепочечной ДНК на отдельные цепи. В смесь добавляют набор всех пуриновых и пиримидиновых оснований, праймеры и термостабильную ДНК-полимеразу. Праймерами называются синтетические короткие участки ДНК, комплементарные той нуклеиновой кислоте, которую амплифицируют. Праймеры обычно располагаются с концов (фланкируют) амплифицируемого участка ДНК и служат затравками (инициаторами) полимеризации. Реакционную смесь охлаждают (обычно до 70-76°C). При этом термостабильная полимераза достраивает 2 разошедшиеся цепи ДНК до полных молекул, удваивая тем самым исходное количество генетического материала. Удвоенное количество генетического материала подвергают повторному расхождению и удвоению и так далее. Проведя несколько десятков циклов полимеризации, можно поднять содержание

ДНК в исследуемом материале до порога обнаружения. В результате ПЦР образуются копии ДНК исследуемых микроорганизмов, которые можно идентифицировать с помощью электрофореза, ИФА, блот гибридизации со специфичными зондами (*Dot* и *Slot-Blot*, *Southern Blot*). Метод высоко специфичен, чувствительность теоретическая – один специфичный участок ДНК или РНК, в реальной практике около 10 микроорганизмов в мл или грамме материала. В случае определения молекул РНК (например, вируса ВИЧ) для проведения полимеразной цепной реакции предварительно получают его ДНК-копию с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы). ПЦР используют не только для диагностики микроорганизмов, но и для анализа наследственных и онкологических заболеваний, идентификации личности и т.д. [201]. *Real-time* ПЦР может быть эффективна для диагностики биоплёнка-ассоциированной инфекции. В качестве праймера могут быть использованы фрагменты генов адгезии, а также гены, связанные с функционированием биоплёнки [202].

## 7.8 Серологический метод

Этот метод чаще имеет вспомогательное значение при установлении этиологического диагноза. С его помощью нельзя определить чувствительность к антимикробным препаратам и уточнить источник инфекции. Возможности серологического метода снижены особенно при диагностике условно-патогенных микроорганизмов, которые, как правило, имеют большое количество сероваров, являются нормальными представителями микрофлоры человека, а в крови здоровых людей присутствует определенный уровень антител к ним. При хронических формах заболевания возможна диагностика инфекционного процесса по росту титра антител с аутокультурой. Диагностическим критерием в данном случае является нарастание титра антител в процессе болезни в 4 раза и более [203]. Возможность гуморального специфического ответа на биопленочные элементы изучалась параллельно с анализом роли биопленок в патологии человека. Исследователи понимали, что должны существовать структуры с антигенными свойствами, которые присутствуют в БП, но практически не обнаруживаются у планктонных форм. Антигенность этих структур предполагает возможность развития полноценного антителозависимого иммунного ответа. Эксперименты подтвердили теоретические предположения. Позитивная антибиопленочная роль антител была показана в опытах *in vitro* с биопленками *P. aeruginosa*, в которых сыворотка, содержащая антитела к мукоиду (основой которого является альгинат) и комплемент, обеспечивала опсонин-зависимую активацию фагоцитоза, приводящую к деструкции БП. Были предприняты попытки использовать методы серотипирования и серодиагностики для идентификации наличия матрикса биопленки, которые на сегодняшний день находятся в стадии разработки [204].

## **7.9 Биологический (экспериментальный) метод или метод биопробы**

Метод основан на избирательной чувствительности разных лабораторных животных к определенным микроорганизмам. Животных определенного вида, возраста и массы тела заражают чистыми культурами или исследуемым материалом. Микроорганизмы быстро размножаются при попадании в кровь и внутренние органы, откуда их и выделяют. Метод высоко специфичен при выделении облигатно-патогенных микроорганизмов и теоретически позволяет определить один микроорганизм в исследуемом материале. Как правило, при диагностике условно-патогенной флоры не используется из-за неспецифичности клинической картины, вызываемой этими микробами и возможной быстрой гибели бактерий под действием защитных факторов макроорганизма [203].

## **7.10 Аллергический метод**

Метод основан на постановке кожно-аллергических проб. Применяют для выявления гиперчувствительности к различного рода антигенам (аллергенам) при диагностике инфекционных заболеваний (туберкулез, бруцеллез и др.). На диагностическую ценность кожно-аллергических проб при заболеваниях, вызванных условно-патогенной флорой, существуют противоположные точки зрения. Одна – не применяется в связи с наличием сенсибилизации к представителям нормальной микрофлоры и связанной с этим малой специфичностью. Другая – может служить как критерий диагноза при хронических инфекциях, которые всегда сопровождаются аллергизацией макроорганизма [203]. Диагностика с использованием аллергического метода наличия у бактерий, вызвавших инфекционный процесс, матрикса БП не разработана.

## **7.11 Определение количества бактерий в исследуемом материале**

Материал гомогенизируют и концентрируют. Готовят разведения из 1 г или 1 мл материала в  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  и  $10^5$  раз в теплом 0,5% растворе хлорида натрия с 0,01% желатина (для предупреждения осмотического шока бактерий). Производят посев одной капли автоматической пипеткой (50 мкл) приготовленных разведений на секторы питательных сред в бактериологических чашках или в отдельные чашки. Посев можно также проводить калибровочной платиновой петлей с диаметром ушка в 2 мм. При наличии указаний на вероятного возбудителя лучше использовать селективные среды. В стандартный набор сред включают: желточно-солевой агар (для стафилококков), среду Эндо или другой селективный



агар для энтеробактерий, кровяной агар (для стрептококков и др.), среду Сабуро (для кандид и других грибов), при необходимости специальную среду для анаэробов. Подсчет колоний проводят на 1 г или мл изучаемого материала. Учитывая сложность приведенного выше метода, предложен ряд упрощенных методик. Широко используется для ориентировочного изучения микробной обсемененности метод, предложенный Царевым-Мельниковым. Стерильной стандартной бакпетлей диаметром 3 мм берут соскоб раневой поверхности и осторожно высевают на чашку Петри с кровяным агаром (рис.7.5) в сектор А (40 штрихов с одного забора). Петлю обжигают и проводят 4 раза по поверхности агара из сектора А в сектор I, затем снова обжигают и проводят через сектор I в сектор II четыре раза. Процедуру повторяют еще раз из сектора II в III. В зависимости от того, в каком секторе и в какой степени происходит рост колоний, судят о микробной обсемененности. Данная зависимость между числом колоний в секторе чашки и интенсивностью обсемененности представлена в таблице 7.2 [205].

Таблица 7. 2 – Зависимость степени обсемененности единицы материала от числа колоний, выросших в различных секторах чашки Петри

Количество бактерий в 1мл или г материала	Число колоний в секторе			
	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>
$10^4$	1-5	роста нет	роста нет	роста нет
$5 \times 10^4$	14-25	-//-	-//-	-//-
$10^5$	40-50	5-10	-//-	-//-
$5 \times 10^5$	150-200	15-20	-//-	-//-
$10^6$	сплошной рост	60-80	-//-	-//-
$5 \times 10^6$	-//-	150-200	-//-	-//-
$10^7$	-//-	сплошной рост	-//-	-//-
$5 \times 10^7$	-//-	-//-	5-10	-//-
$10^8$	-//-	-//-	20-40	-//-
$5 \times 10^8$	-//-	-//-	80-100	10-20

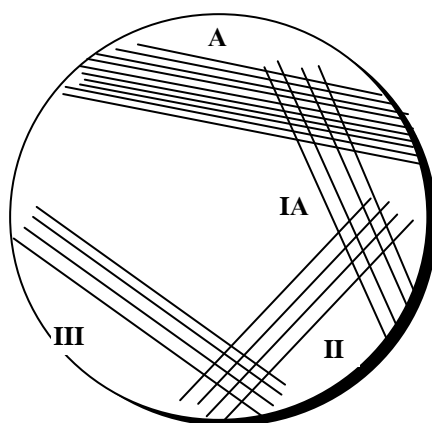


Рисунок 7.5 – Схема посева на чашку с агаром по Цареву-Мельникову

*7.11.1 Способ определения количества колоний образующих единиц бактерий, способных формировать биопленку*

Существующие методы определения КОЕ разработаны только для планктонных форм бактерий без учета способности микроорганизмов формировать биопленку, что снижает достоверность результатов. Известен способ определения численности бактерий путем подсчета колоний на мембранных фильтрах [206]. Пробы фильтруют через мембранные фильтры с необходимыми размерами пор, после чего фильтр помещают на агаризованную среду или просто на фильтровальную бумагу, пропитанную питательной средой. Колонии образуются на поверхности фильтра благодаря проникновению через него питательных веществ из среды.

Предложен метод определения наиболее вероятного числа бактерий (метод предельных разведений), который позволяет провести грубый подсчет числа жизнеспособных клеток [207]. Он состоит в том, что готовят несколько последовательных разведений культуры в ростовой среде и после инкубации подсчитывают число пробирок, в которых отсутствует рост. Предполагается, что в эти пробирки при посеве не было внесено ни одной жизнеспособной клетки. Принимая, что распределение клеток описывается формулой Пуассона, среднее число клеток в данном разведении вычисляют по формуле:

$$P_0 = e^{-t},$$

где  $e=2,718$ ,  $t$  – среднее, а  $P_0$  – отношение количества пробирок, в которых отсутствует рост, к общему числу пробирок в данном разведении.

Затем среднее значение умножают на фактор разбавления и корректируют с учетом объема инокулята, чтобы вычислить число жизнеспособных клеток в исходной культуре.

Для подсчета КОЕ в составе биопленки изолят бактерий выращивают на мясо-пептонном агаре при 37<sup>0</sup>С в течение 24 часов. В асептических условиях с помощью бактериологической петли готовят взвесь микроорганизмов в бульоне Мюллера-Хинтона концентрации  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, что соответствует оптической плотности на денситометре 0,5 единиц оптической плотности. В лунки планшета вносят по 200 мкл полученной взвеси бактерий, на один изолят отводят 5 лунок. Планшет со взвесью инкубируют в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 24 часов. Из лунок с помощью стерильной пипетки удаляют содержимое. Лунки промывают четырехкратно дистиллированной водой. В лунки добавляют по 200 мкл 20% раствора сахарозы на 0,01 М фосфатном буфере с рН 8,2. В лунки планшета помещают соответствующий по размеру и форме наконечник ультразвукового аппарата «ЛОРА-Дон», включают аппарат в режиме III на 30 секунд, обрабатывают последовательно каждую лунку. Кроме этого можно использовать ультразвуковой диспергатор (производства лаборатории ультразвуковых процессов и оборудования Белорусского государственного университета информатики и

радиоэлектроники) для разрушения матрикса биопленки. Содержимое 5 лунок собирают в пенициллиновый флакон с 9 мл стерильного физиологического раствора. Готовят разведения полученной взвеси микроорганизмов  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-11}$ . Взвесь переносят на чашку Петри с агаром. При этом на каждое разведение отводят две чашки Петри для наиболее точного результата: в одну чашку вносят 0,5 мл взвеси, во вторую – 1 мл. Чашки Петри инкубируют в термостате при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов. Подсчитывают КОЕ бактерий, находящихся в составе биопленки.

Описанный способ определения КОЕ бактерий, способных формировать биопленку, позволяет избежать искажения результатов исследования, связанных с наличием экзополисахаридного матрикса [208].

### **7.12 Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам**

В качестве критерия чувствительности микробов к антибиотикам избирают их концентрации в сыворотке крови и других биотопах макроорганизма после введения среднетерапевтических и максимально допустимых доз препарата [209]. По степени чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии чаще всего разделяются на чувствительные, умеренно чувствительные (промежуточные) и устойчивые, или резистентные [210].

Чувствительные – рост микроорганизмов прекращается при терапевтических концентрациях антибиотиков (назначены среднетерапевтические дозы препарата) в месте очага инфекции, например, в крови.

Умеренно чувствительные – для подавления роста микроорганизмов требуются максимально допустимые дозы антибиотика.

Устойчивые (резистентные) – бактериостатический эффект может быть достигнут только *in vitro* при добавлении таких высоких концентраций антимикробного препарата, которые являются токсичными для пациента.

Для характеристики популяции бактерий часто используют следующие показатели:

- МИК (минимальная ингибирующая концентрация) или МПК (минимальная подавляющая концентрация), соответствует наибольшему разведению препарата, тормозящему рост исследуемой культуры микроорганизма в стандартных условиях опыта. Устанавливают посевом испытуемой культуры на плотные или жидкие (полужидкие) питательные среды, содержащие различные концентрации антимикробного препарата.

- $\text{МИК}_{50}$  – к данной концентрации антибиотика чувствительно 50% исследуемых изолятов микроорганизмов;

- $\text{МИК}_{90}$  – к данной концентрации антибиотика чувствительно 90% исследуемых изолятов бактерий.

– МБК – минимальная бактерицидная концентрация; минимальная концентрация антимикробного препарата, вызывающая полную гибель бактерий в стандартных условиях опыта. Как и МПК, устанавливают посевом испытуемой культуры на плотные или жидкие среды, содержащие различные концентрации антимикробного препарата. Однако в дальнейшем из стерильных зон или близких пробирок без роста делают посев на питательные среды. Появление роста указывает на бактериостатическое действие препарата в данной концентрации, отсутствие – на бактерицидное. Обычно МБК соответствует либо превышает величину МИК на одно или несколько разведений.

Антимикробная активность одного и того же антибиотика не всегда совпадает при испытании его *in vitro* и при проведении антимикробной терапии, что вызвано активацией или инактивацией ферментными системами макроорганизма, неадекватностью условий, в которых проявляется действие антибиотика (например, низкая рН среды в месте инфекции, невозможностью проникновения препарата в гнойно-воспалительный очаг) и гетерогенностью микробных популяций по признаку устойчивости к антибиотикам.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам основано на двух основных принципах:

1. Диффузии препарата в агар из бумажных дисков, полосок или лунок (в настоящее время существуют две основные модификации диффузионного метода: дискодиффузионный и Е-тест). На сегодняшний день стандарты, необходимые для учета результатов данных методов, для бактерий в составе биопленок не разработаны.

2. Серийных разведений в бульоне или в плотной питательной среде. Применим и для определения чувствительности бактерий в составе БП к антибиотикам.

#### 7.12.1 Диффузионные методы

Диффузионный метод основан на регистрации диаметра зоны ингибиции (задержки) роста исследуемого микроорганизма антимикробным препаратом [211, 212].

#### 7.12.2 Метод бумажных дисков (дискодиффузионный метод)

Метод наиболее прост и широко используется в рутинной клинической практике, однако показывает лишь качественный (вернее, полуколичественный) результат. Образование зоны ингибиции роста происходит в результате диффузии антибиотиков из носителя (диска) в питательную среду. Возникает зона задержки роста бактерий, которая описывается логарифмической зависимостью. Величина диаметра зоны ингибиции роста коррелирует с величиной МПК, поэтому метод позволяет косвенно судить о величине МПК. В результате микроорганизм относят к одной из категорий чувствительности.

Для его проведения используются стандартные диски, содержащие определенное количество антибиотиков, и стандартная питательная среда, необходимая для роста данного вида микроорганизма. Из суточной микробной культуры готовят взвесь на физрастворе (1 млрд. микробных тел в 1 мл) и согласно методике вносят определенную микробную нагрузку. На поверхность чашки с плотной средой наносят 1 мл микробной культуры и равномерно покачиванием чашки или стерильным шпателем распределяют ее по всей поверхности среды. Остаток удаляют пипеткой и сливают его в дезраствор. Среду с бактериями подсушивают 10-15 минут при комнатной температуре, после чего на поверхность газона стерильным пинцетом накладывают диски с антибиотиками (не более 6 на чашку диаметром 10 см) на расстоянии  $>1,5$  см друг от друга и от краев чашки. Условия инкубации зависят от вида микроорганизма (для большинства видов – в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов).

Учет чувствительности производят в падающем свете на фоне темной поверхности, измеряя диаметр задержки роста. Окончательный результат определяют по специальной таблице (обычно прилагается к набору дисков для определения чувствительности к антибиотикам) путем сопоставления диаметра зон задержки роста испытанной бактериальной культуры с пограничными значениями приведены в таблицах (Clinical and Laboratory Standards Institute, EUCAST clinical breakpoint table). Исследуемую культуру относят к одной из трех категорий: чувствительная, умеренно чувствительная (промежуточная) и устойчивая.

Описанный метод является полуколичественным. Для получения количественных результатов используют методы серийных разведений.

#### *7.12.3 E-тест (E-test или эпсилометрический метод)*

Метод близок по технологии постановки к методу бумажных дисков. В качестве носителя используется узкая полоска полимера (0,5х6,0 см), пропитанная различными концентрациями антибиотиков (от минимальных до максимальных). Ингибция роста микроорганизма вокруг полоски носителя происходит в зоне, где концентрация антибиотиков, диффундирующих из носителя, выше МПК. Концентрации антибиотиков нанесены на соответствующем отрезке поверхности носителя. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны ингибиции роста вплотную подходит к носителю. Е-тест сочетает простоту постановки метода бумажных дисков и точность метода серийных разведений. Основным недостатком Е-теста является высокая стоимость исследования [213].

Подробные инструкции по проведению Е-теста прилагаются изготовителем.

#### *7.12.4 Методы серийных разведений*

Методы позволяют наиболее точно количественно оценить чувствительность выделенного микроба к антибактериальным средствам и определить МПК препарата. Методы серийных разведений основаны на

прямом определении величины МПК, определяемой как минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма. Для определения величины МПК концентрации антибиотиков вносят в питательную среду, которую засевают культурой исследуемого микроорганизма, и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста.

Точность методов серийных разведений ограничивает дискретность используемых концентраций антибиотиков. При использовании традиционного метода двукратных разведений фиксируемая экспериментатором МПК не соответствует истинной величине этого показателя. Возможно использование разведений, не кратных двум.

В зависимости от характера используемой питательной среды различают метод серийных разведений в бульоне, метод серийных разведений в агаре. В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют как методы серийных макро-разведений, так и микро-разведений. Разновидностью метода серийных разведений является также метод, основанный на использовании только двух концентраций антибиотиков или даже одной концентрации, соответствующих пороговым (то есть концентрациям, отделяющим чувствительные микроорганизмы от промежуточных и промежуточные от резистентных). Метод обеспечивает получение качественных результатов, позволяющих отнести исследуемый микроорганизм к определенной категории чувствительности [214].

#### *7.12.4.1 Метод серийного разведения антибиотика в питательной среде (бульоне)*

Вначале готовят основной раствор, содержащий определенную концентрацию антибиотиков в специальном растворителе. Из него готовят ряд убывающих разведений антибиотиков в пробирках с бульоном (чаще 2-х кратные, но для повышения точности используют и др. разведения) и добавляют испытываемую культуру (обычно  $10^3$ - $10^6$  бактериальных клеток). Контролем служит пробирка с питательной средой с внесенным микроорганизмом, но без антибиотика. Сроки инкубации зависят от вида микроорганизма. Определяют МПК, которая соответствует концентрации препарата в последней пробирке с видимой задержкой роста (прозрачная питательная среда). Для определения МБК из нескольких последних пробирок с задержкой роста делают посев петлей на сектора чашки Петри. За МБК, которая, как правило, на несколько разведений меньше МПК, принимают концентрацию препарата в последней пробирке, посев из которой не дал роста [215].

#### *7.12.4.2 Метод серийного разведения антибиотика в питательной среде для бактерий, способных формировать биопленку*

Формируют биопленку в лунках полистиролового планшета. Для этого изолят бактерий выращивают на мясо-пептонном агаре при 37<sup>0</sup>С в

течение 24 часов. В асептических условиях с помощью бактериологической петли готовят взвесь микроорганизмов в бульоне Мюллера-Хинтона в концентрации  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл, что соответствует на денситометре 0,5 единиц оптической плотности. В лунки планшета вносят по 150 мкл полученной взвеси бактерий. Планшет с разведением микроорганизмов инкубируют в термостате при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 часов. Из лунок планшета с помощью стерильной пипетки удаляют взвесь планктонных форм бактерий. Лунки промывают четырехкратно дистиллированной водой, на стенках лунок остается сформированная биопленка.

Определяют количество колонии образующих единиц в биопленке. С этой целью в лунки планшета с биопленкой добавляют по 150 мкл стерильного бульона Мюллера-Хинтона и помещают соответствующий по размеру и форме наконечник ультразвукового аппарата «ЛОРА-Дон», включают аппарат в режиме III на 30 секунд, обрабатывают последовательно каждую лунку. С этой же целью может быть использован ультразвуковой диспергатор производства лаборатории ультразвуковых процессов и оборудования Белорусского государственного университета информатики и радиоэлектроники. Каплю полученного содержимого лунки планшета помещают в камеру Горяева. С помощью светового микроскопа при увеличении в 600 раз выполняют подсчет бактериальных клеток в малых квадратах камеры ( $\geq 20$ ) и рассчитывают среднее количество бактерий в малом квадрате (размер  $0,2 \times 0,2$  мм, глубина 0,1 мм). Производят расчет количества колоний образующих единиц в биопленке по формуле:

$$\text{КОЕ/мл в БП} = \text{количество клеток в малом квадрате} \times 4 \cdot 10^6$$

В результате расчета определяют микробную нагрузку в бактериальной биопленке, которую в последующем доводят до конечной концентрации бактерий в лунке  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл.

Далее определяют МПК антибиотика для бактерий, формирующих биопленку. В лунки 96-луночного полистиролового планшета с частично разрушенной ультразвуком БП помещают последовательные разведения антибиотика для получения конечной концентрации бактерий в лунке, равной  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Инкубируют планшет в течение суток при температуре  $35-37^\circ\text{C}$  и проводят учет полученных результатов. Наличие роста микроорганизма в бульоне (помутнение бульона) свидетельствует о том, что данная концентрация антибиотика недостаточна, чтобы подавить его активность. Наименьшую концентрацию антибиотика из серии последовательных разведений, где визуально не определяется бактериальный рост, принято считать МПК. Согласно таблицам европейского комитета по тестированию антибиотикорезистентности (EUCAST clinical breakpoint table, Clinical and Laboratory Standards Institute) определяют чувствительность возбудителя к антибиотику.

Метод позволяет определять минимальную подавляющую концентрацию антибиотика для бактерий, способных формировать

био пленку, что дает возможность эффективно использовать антибактериальный препарат, при этом используемые реактивы и оборудование доступны для всех микробиологических лабораторий [216].

#### 7.12.4.3 Метод серийных разведений в плотной питательной среде

Этот метод более чувствителен и точен, чем метод бумажных дисков. Каждый антибиотик испытывают, как правило, в трех пороговых концентрациях (исходя из уровней чувствительности микроорганизмов), которые добавляют к расплавленному и охлажденному агару. Агар с антибиотиками разливают в чашки Петри. Обязательный контроль – чашка с агаром без антибиотиков. Посев производят петлей или лучше штампом-репликатором, который позволяет одновременно определить чувствительность к трем концентрациям антибиотиков 25-50 культур (в зависимости от числа лунок в штампе). Учет роста для большинства бактерий в термостате осуществляют спустя сутки. Культура считается чувствительной, если на месте посева нет роста ни одной колонии. Оценка результатов:

- чувствительные (можно применять антибиотики в средней терапевтической дозе) культуры – рост которых подавлен всеми тремя концентрациями;
- среднечувствительные (можно применять только в увеличенной дозе) – рост подавляют 2-я и 3-я концентрации антибиотиков;
- умеренно устойчивые – подавляет только 3-я наиболее высокая концентрация (возможно только местное применение антибиотиков);
- устойчивые (антибиотики применять нельзя по тестам *in vitro*) – растут на всех трех концентрациях [217].

#### 7.12.5 Ускоренные методы

Данные методы позволяют получить результат через 3-6 часов. Используют два основных принципа.

Первый принцип основан на ускоренном определении роста микроорганизмов по изменению окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) или продукции микроорганизмами биологически активных веществ (протеин А стафилококка, протеаз и др.). Чаще всего пользуются методом, основанным на изменении ОВП среды в процессе роста микроба в присутствии антибиотиков [218].

При использовании метода бумажных дисков или серийных разведений антибиотиков в агаре через 4-6 часов роста культуры поверхность чашки обрабатывают индикатором. В местах роста микроба среда окрашивается в красный цвет, при отсутствии роста микроба цвет среды не меняется. Учет и критерии оценки, как и при обычных методах.

На ускорении роста микроорганизмов с использованием специальных добавок к питательной среде основаны другие известные тесты. Разработаны специальные тест-системы ускоренного определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, например



поставляемые фирмой «BIOMERIEUX». В стрипы с критическими концентрациями препаратов (до 30 антибиотиков) вносят определенную концентрацию испытываемого изолята на специальной среде. После инкубации 4-6 ч. определяют прирост мутности раствора по сравнению с контрольными на автоматическом анализаторе ATB Expression или визуально. Среди производителей тест-систем также необходимо отметить Becton Dickinson, Abbott Diagnostics, Difco/Pasco Laboratories, Roche Diagnostics, Vitek Systems.

На сегодняшний день разработана тест-система МВЕС™ (*Innovotech, Inc.*, Канада) для определения антимикробной активности химиопрепаратов против бактерий, образующих биопленки, недоступные на рынке стран ЕврАзЭС [219].

## 8. МЕТОДЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА БИОПЛЁНКИ

Научные исследования, связанные с изучением биоплёнок, фрагментарны и немногочисленны, однако потребность решения практических медицинских задач, связанных с биоплёнками, весьма актуальна.

Воздействие на микробные БП, а, следовательно, и лечение ассоциированных с ними инфекций, на сегодняшний день представляет собой трудную и не решенную окончательно задачу, что обусловлено повышенной устойчивостью данных сообществ к антимикробным препаратам и факторам иммунной защиты организма [220, 221]. Биопленки бактерий невосприимчивы к традиционной антибактериальной терапии, благодаря передачи маркеров резистентности между клетками микроорганизмов, из-за диффузионных ограничений, обусловленных внеклеточным матриксом, инаktivации препарата, наличия метаболически неактивных клеток-персистеров [222]. В совокупности эти свойства делают биопленки значительно более устойчивыми к антибиотикам, чем планктонные клетки [223].

### 8.1 Химиопрепараты и биопленки

Терапевтическое воздействие на биопленки может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии бактерий к поверхности, блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией, а также может сочетаться с собственно бактерицидными агентами. Подобное лечение, действующее на структуру или функции биопленок, может оказаться более эффективным, чем стандартная антибактериальная терапия [224].

Согласно исследованиям О. Kandemir и соавторов, одним из перспективных методов является применение комбинации этиотропного антибактериального препарата и кларитромицина. Детальное изучение механизма действия кларитромицина на образование БП, позволило выявить, что структура биопленки изменяется, уменьшается количество альгината, гексозы, истончается гликокаликс, тем самым повышается проникновение антимикробного препарата, который использовали для подавления синегнойной палочки, в частности – цефтазидима. Эффективность цефтазидима оказалась значительно выше в присутствии кларитромицина, что привело к подавлению роста синегнойной палочки [225]. Проводились также клинические исследования пациентов с муковисцидозом и диффузным панбронхиолитом, в ходе которых была показана эффективность совместного использования для воздействия на синегнойную палочку кларитромицина с этиотропными антибиотиками [226].

В результате исследования С.Б. Фадеева установлено, что оксациллин и имипенем стимулировали образование биоплёнок у

госпитальных изолятов MRSA. Влияние гентамицина было дозозависимым –  $\frac{1}{8}$  МПК антибиотика не оказывала существенного влияния на формирование биоплёнок, а  $\frac{1}{2}$  МПК – усиливала изучаемый признак у всех изолятов. Рифампицин снижал формирование биоплёнок только в концентрации  $\frac{1}{2}$  МПК у 28 из 30 изолятов MRSA, тогда как ванкомицин в концентрации  $\frac{1}{2}$  МПК подавлял это свойство у всех изолятов. Ципрофлоксацин в концентрации  $\frac{1}{8}$  МПК угнетал формирование биоплёнок у 19 изолятов MRSA, а в концентрации  $\frac{1}{2}$  МПК – у всех 30. Подобное действие продемонстрировал кларитромицин, подавляя образование БП у всех изолятов при концентрации  $\frac{1}{2}$  МПК и у 23 изолятов из 30 – при  $\frac{1}{8}$  МПК. Автор отмечает, что метициллинорезистентные изоляты *S. aureus*, как возбудители госпитальных хирургических инфекций, продемонстрировали вариабельность изменения способности формировать биоплёнки в зависимости от влияния на них различных антибиотиков. Так, ципрофлоксацин, кларитромицин и рифампицин подавляли образование биоплёнок MRSA, а гентамицин, оксациллин и имипенем стимулировали этот защитный микробный фактор. Таким образом, использование гентамицина при проведении стартовой эмпирической антибактериальной терапии госпитальных хирургических инфекций, вызванных MRSA, может снизить эффективность лечения за счет стимуляции способности стафилококков формировать биоплёнки. Назначение в таких случаях  $\beta$ -лактамов не только не окажет ожидаемого лечебного результата, поскольку указанные возбудители изначально к ним резистентны, но и, вероятно, может снизить эффективность других, позже назначенных антибиотиков [227].

Выявлена новая мишень – внеклеточная ДНК матрикса биопленок – для воздействия на бактерии с целью повышения эффективности антибиотикотерапии. Использование ДНК матрикса, как дополнительной мишени при терапии, позволяет повысить эффективность действия различных антибиотиков на бактерии из различных семейств, находящиеся в биопленках, снизить вероятность возникновения, распространения и сохранения устойчивости к лекарственному средству, сократить общую продолжительность терапии, уменьшить сроки пребывания пациентов в стационаре и снизить частоту рецидивов заболевания [228].

Другим способом улучшения воздействия АБ на биоплёнки является улучшение и совершенствование форм их доставки [229]. Известно, что липосомальный комплекс амфотерицина В обладает выраженной активностью по отношению к резистентным биопленкам, продуцируемым *Candida spp.*, что позволяет использовать его при инвазивных системных микозах.

А. Macchi с соавторами проводили изучение эффективности комбинации тиамфеникола (антимикробный препарат группы амфениколов с широким спектром активности, включающим аэробные грамположительные и грамотрицательные возбудители, а также некоторые анаэробы) с N-ацетилцистеином для терапии пациентов с хроническим

риносинуситом. К окончанию терапии клиническое и бактериологическое выздоровление (эрадикация бактерий была подтверждена культуральным методом и сканирующей электронной микроскопией) составило 88% [230].

Результатами пилотного сравнительного клинического исследования N-ацетилцистеина в педиатрической практике являются выводы о том, что использование препарата у пациентов с рецидивирующими инфекциями верхних дыхательных путей ведет к снижению частоты обострений заболевания [231].

В исследовании F.Li и соавторов на животных моделях были изучены эффекты амброксола на БП, сформированные мукоидными изолятами *P. aeruginosa* [232]. Электронная микроскопия продемонстрировала нарушение микроструктуры биопленок после использования амброксола. Число бактериальных колоний в интубационных трубках в группе животных, леченных амброксолом, было значительно ниже, по сравнению с группой плацебо (физиологический раствор). Патологические изменения в легких животных были менее выражены на фоне активной терапии. Цитокиновый ответ, в частности уровень интерферона (INF $\gamma$ ) и отношение INF $\gamma$  к содержанию интерлейкина 10, также был менее выражен после терапии амброксолом. В другом экспериментальном исследовании терапия амброксолом уменьшала толщину биопленок, увеличивала их пористость и снижала среднюю дистанцию диффузии [233]. Кроме того, амброксол продемонстрировал значительную антагонистическую активность по отношению к механизму формирования биопленок – Quorum sensing [234].

Миноциклин в сочетании с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) предотвращает микробную колонизацию катетеров. В исследовании, подтверждающем вышесказанное, каждый из сегментов катетеров был инкубирован с различными дозами следующих растворов – стрептокиназой, гепарином, ванкомицином, ванкомицином с гепарином, EDTA. Эффект редукции колонизации *S. epidermidis*, *S. aureus* или *C.albicans* раствором миноциклина с EDTA оказался в значительной степени более выраженным в сравнении с прочими препаратами. Важно отметить, что эффект подавления наблюдался в отношении как свежей, так и зрелой биопленки [235].

## 8.2 Ферменты и биопленки

К ферментам, разрушающим матрикс биопленки, относятся протеазы, дезоксирибонуклеазы. Так, использование ДНКазы предотвращает образование БП представителями рода *Staphylococcus* и *Enterococcus in vitro* [236]. Доказана эффективность фермента дисперсин Б при его применении против биопленки *S. aureus* и *S. epidermidis* [237]. В настоящий момент проводятся исследования по изучению возможности использования различных антибиоплёночных агентов в клинической практике. Среди таких препаратов выделяют средства, хелатирующие

железо: EDTA, дефероксамин, лактоферрин; поверхностно активные вещества: ксилит, фарнезол; ферменты, разрушающие матрикс биоплёнок, например, дисперсин Б; сигнальные молекулы, активирующие депрессию биоплёнки: полиненасыщенные жирные кислоты, оксид азота; ингибиторы Quorum sensing: аналоги гомосеринлактонов (furanone C30) и псевдоаутоиндукторы. Проведено исследование на модели *in vitro* сочетанного действия лактоферрина и ципрофлоксацина на рост и процесс формирования биоплёнок *P. aeruginosa*, являющимся возбудителями оппортунистических инфекций. Комбинированный эффект воздействия лактоферрина и ципрофлоксацина заключается в том, что при использовании низких концентраций антибиотика интенсивность процесса формирования биоплёнок клетками культуры *P. aeruginosa* значительно уменьшается. Данное сочетание может оказаться эффективным методом лечения пациентов с иммунодефицитом с целью предотвращения возникновения хронических очагов инфекции [238].

### 8.3 Физические факторы, металлы и биопленки

Одним из направлений воздействий на биопленки является использование физических факторов. Ряд авторов указывает на эффективность импульсных электрических полей, акустических ударных волн, ультразвука [239, 240]. Исследование показали эффективность сочетания антибиотиков и ультразвука в борьбе с БП [241].

Для предотвращения формирования микробных сообществ на изделиях медицинского назначения активно используется покрытие из наночастиц серебра [242]. Способ основан на том, что серебро ингибирует репликацию ДНК, экспрессию рибосомных и других клеточных белков, а также препятствует функционированию бактериальной электрон-транспортной цепи [243]. Доказано, что наночастицы серебра подавляют образование биопленки *P. aeruginosa* и *S. epidermidis* [244, 245].

### 8.4 Антимикробные пептиды и биопленки

Целый ряд работ указывает на эффективность антимикробных пептидов в отношении бактериальной биопленки изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с муковисцерозом [246]. Эти вещества, связываясь с фрагментами клеточных мембран микроорганизмов, нарушая ее стабильность. В исследованиях показано, что некоторые пептиды способны предотвращать образование БП золотистым стафилококком [247].

В настоящее время описано более 900 индивидуальных антимикробных пептидов и белков, принадлежащих к разным гомологическим семействам [248, 249]. Катионные антимикробные пептиды, выделяемые из нейтрофилов и тканей эпителиального происхождения – дефензины, протегрины, кателицидины и т. д., обладают

широким спектром действия, оказывая антимикробное, противовирусное, антипротозойное и антигрибковое действия [250]. Установлено, что катионные антимикробные пептиды стимулируют продукцию цитокинов, миграцию и пролиферацию клеток [251], модулируют гуморальный иммунный ответ и повышают титр антител после вакцинации [252].

Обнаруженное действие тромбодифензинов на биоплёнки грибов может быть использовано при создании антимикотических препаратов, способных также противостоять формированию БП [253].

Выявлено модифицирующее влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на образование биопленок микроорганизмами. Поскольку биопленки – многофакторный феномен, то, вероятно, тромбодифензины действуют на различные этапы их развития по нескольким механизмам. Возможно, под воздействием антимикробных пептидов из тромбоцитов *in vitro* большая часть микробной популяции гибнет, а сохранившие жизнеспособность клетки-персистеры, присутствующие в бактериальной популяции до ее контакта с тромбодифензинами, обеспечивают более активное формирование биопленок [254, 255].

Влияние антимикробных пептидов тромбоцитарного лизата на биопленкообразующие КОС не ограничивается лишь бактерицидным эффектом. Инкубация стафилококков с антимикробными тромбоцитарными пептидами способствует селекции резистентного бактериального фенотипа, о чем свидетельствуют как изменение физико-химических свойств стафилококков (гидрофилизация поверхности и повышение электрокинетического потенциала), так и снижение биопленкообразования [256].

АМП цитропин 1.1, липопептиды Palm-KK-NH<sub>2</sub> и Palm-RR-NH<sub>2</sub>, омиганан, пексиганан и темпорин А проявляют сильную антибактериальную активность в отношении грамположительных изолятов, в то время как грамотрицательные бактерии менее чувствительны. Антимикробная активность испытуемых пептидов против биопленок, образованных грамположительными микроорганизмами, значительно сильнее по сравнению с обычными противомикробными препаратами [257].

## 8.5 Бактериофаги и биопленки

По мнению многих авторов использование бактериофагов может стать альтернативой использования антибиотиков в борьбе с биопленками [258, 259, 260, 261]. Бактериофаги способны выделять ферменты, разрушающие матрикс биопленки. Кроме того, они лизируют клетки-персистеры, устойчивые ко многим агентам [262, 263]. Бактериофаги реплицируются в бактериальных клетках БП, разрушая ее структуру [264]. Исследования подтвердили эффективность их применения в профилактике образования биопленки *S. epidermidis* и *P. aeruginosa* на медицинских

устройствах [265].

Установлено, что положительный клинический результат после аэрозольного применения антисинегнойного бактериофага пациентам с муковисцидозом связан с эффектом активной деградации экзополисахаридного компонента биопленочного матрикса, который возникает при проникновении бактериофагов во внутренние слои микробной БП [266].

В работе L.Carson и соавторов [267] использованы литические бактериофаги для лечения и предотвращения образования биопленок *P. mirabilis* и *E. coli* на урологических устройствах и катетерах. Наблюдалось предотвращение формирования биопленок на биоматериалах катетеров после их импрегнации с гидрогель-связанными бактериофагами. В результате применения фагов биопленочная ассоциация была редуцирована. При этом по сравнению с необработанным контролем происходило отчетливое в 90% случаев подавление образования биопленок госпитальными изолятами *P. mirabilis* и *E. coli*. Для подавления формирования биопленок, образованных *S. epidermidis* в катетерах, также были использованы бактериофаги [268, 269].

## 8.6 Блокаторы Quorum Sensing

Блокада QS в настоящее время признается в качестве жизнеспособного подхода к разработке новых терапевтических средств в лечении бактериальных инфекций. Не смотря на то, что ингибиторы QS могут ослабить вирулентность, уменьшить образование БП, повысить бактериальную чувствительность к лекарственной терапии, они могут быть использованы только в качестве вспомогательных лекарственных средств, так как они не обязательно имеют бактерицидный и/или бактериостатический эффект. Бактерии могут использовать различные пути и аутоиндукторы – малые сигнальные молекулы, используемые для межклеточного взаимодействия. Только грамотрицательные бактерии используют лактоны ацилированного гомосерина (AHL) в качестве аутоиндукторов, в то время как только грамположительные бактерии используют аутоиндуцированные пептиды (AIP) для коммуникации. В тоже время аутоиндуктор-2 (AI-2) опосредует QS у грамположительных и грамотрицательных бактерий. По всем этим причинам разработка и синтез терапевтически полезных ингибиторов сигнальных молекул – не простая задача [270].

Известно несколько способов, чтобы подавлять QS: ингибирование синтеза аутоиндукторов; антагонизм рецепторов аутоиндукторов; ингибирование мишеней после связывания с рецепторами; разрушение аутоиндукторов с использованием антител, ферментов, абзимов; ингибирование транспорта и выделения аутоиндукторов [271, 272].

Блокаторы сигнальных молекул – ингибиторы QS – препятствуют передаче информации внутри биопленки, что ограничивает образование и

рост микробного сообщества. Примером данного способа является использование синтетических фуранов С-30 и С-56, которые блокируют передачу сигнальных молекул, ответственных за выработку факторов вирулентности у стрептококков [273]. Предотвращать образование биопленки *S. aureus in vitro* и *in vivo* способны ингибиторы QS, получившие название РНКШ-ингибирующие пептиды [274]. К блокаторам QS относятся баикалин, циннамальдегид, гаммамелитанин, которые продемонстрировали свою эффективность в сочетании с ванкомицином и клиндамицином [275].

Сублетальные концентрации сиамицина 1 ослабляют образование биопленки *E. faecalis* посредством воздействия на QS, что указывает на перспективность использования сиамицина для лечения энтерококковой инфекции [276].

Авторами изучена эффективность синтетических молекул для ингибирования рецепторов QS синегнойной палочки, LasR и RhlR. Соединение мета-бром-тиолактон (mBTL) ингибирует выработку фактора вирулентности пиоцианина и образования биопленки *P. aeruginosa* [277].

### **8.7 Предотвращение формирования биопленок на имплантируемых устройствах**

Известно немало вариантов покрытия имплантируемых устройств, синтетических материалов, протезов. В литературе описан посеребрённый механический сердечный клапан, который был разработан для предотвращения адгезии микроорганизмов [278]. Для проведения эксперимента имплантировали этот материал морской свинке, заражённой *S. epidermidis*. Оценивая воспаление, авторы показали, что покрытый материал вызвал меньший воспалительный ответ. Однако по другим данным [279, 280] серебрение протеза недостаточно эффективно.

Согласно клиническим исследованиям образование биопленок на катетерах, покрытых AgNPs почти полностью предотвращалось. Было установлено, что антимикробная функция AgNPs, нанесенного на медицинские изделия, снижается, если изделия покрываются мертвыми микроорганизмами или макромолекулами [281]. Изучены противомикробные свойства нанокомпозитных систем на примере лактозамещенного хитозана и AgNPs (Chitlac-nAg). Ряд разведений коллоидного раствора исследовался на планктонных формах *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, образцах слюны в процессе роста биопленок [282]. Для планктонных форм определён бактерицидный и ингибирующий эффекты для всех стрептококковых изолятов в концентрации 0,1%, кроме *S. mitis*, для которого ингибирующая концентрация оказалась на порядок ниже. Субингибирующая концентрация коллоидного раствора для стрептококковых изолятов имеет дозозависимый характер, типично присущий метаболически активным БП. Часто исход антибиопленочной активности AgNPs зависит от формы их



применения. При использовании в виде геля положительное действие оказалось выше. При изучении воздействия AgNPs на формирующиеся на корневом дентине биопленки *E. faecalis* показано, что орошение 0,1% раствором AgNPs не вызвало существенных изменений в структуре БП и жизнеспособности бактерий (в сравнении с обработкой стерильным солевым раствором). При обработке биопленок 0,02% гелем AgNPs [283] нарушалась целостность структуры биопленки и снижалось количество жизнеспособных бактерий (по сравнению с 0,01% гелем AgNPs и раствором гипохлорита).

Выявлена способность полного предотвращения формирования микробных биопленок на титановых имплантатах путем использования двухкомпонентных композиционных покрытий полиуретан-ципрофлоксацин, полилактид-ципрофлоксацин и нанокomпозиционного покрытия полиуретан-полилактид-серебро-ципрофлоксацин [284].

Что касается венозных катетеров, к настоящему времени предложено несколько стратегий предотвращения развития биопленок. К ним относятся: использование антибактериальных мазей; уменьшение длины катетера; использование фильтров для жидкостей, поступающих в катетер; покрытие стенок просвета катетера антибактериальными препаратами. В клинической практике широко применяются катетеры Hydrocath, для изготовления которого используется полиуретан с тонким гидрофильным покрытием из поли-Н-винил-пирролидона, эффективно снижающий бактериальную адгезию [285, 286].

## **8.8 Методы лечения гнойных ран, воздействующие на биопленку**

Для местного лечения ран для борьбы с биопленками ряд авторов предлагает использовать частые и агрессивные хирургические обработки раны (механическое удаление биоплёнки), ультразвуковую кавитацию (разрушение матрикса). Из антисептиков наиболее эффективными показали себя препараты серебра (сильводерм), йодсодержащие препараты (йодповидон). Антисептик полигексанид продемонстрировал свою активность в отношении биопленок [287]. Так же рекомендуется отказаться от марлевого перевязочного материала и использовать полимерные перевязочные материалы, а так же перевязочные материалы на гидрогелевой основе.

Изучено воздействие растворов отдельных антисептиков на биопленку: бактерицидный эффект мирамистина в отношении биопленок MRSA составил 98,5%, диоксидина – 72,5%, лавасепт привел к гибели 95,6% микроорганизмов. Применение озono-кислородной газовой смеси способствовало полной эрадикации микробных биопленок (100% бактерицидный эффект) и MRSA (в контроле 69,1% жизнеспособных бактерий, после воздействия газовой смеси – 0%) [288].

Одним из самых новых методов, используемых в лечении как острых, так и хронических ран является местное использование вакуумных

повязок – метод Vacuum-assisted closure (VAC-терапия), принцип Topical negative pressure. Местно используемые вакуумные повязки в самом общем виде состоят из гидрофильной полиуретановой губки с размером пор от 400 до 2000 микрометров, прозрачного адгезивного покрытия, неспадающейся дренажной трубки и источника вакуума с емкостью для сбора жидкости. В определенных случаях может быть использована поливиниловая (PVA) губка с размером пор 700–1500 микрометров, встречаются упоминания о PVA-губке с размером пор 60–270 микрометров. Специальная вакуумная аппаратура имеет внешнее контрольное устройство, поддерживающее широкий диапазон значений отрицательного давления, и способно обеспечить режим постоянного и прерывистого вакуумного воздействия на рану [289]. При плоских поверхностных дефектах для повышения надежности герметичности системы можно наносить по периметру раны герметизирующую пасту. Используется отрицательное давление от -50 до -200 мм рт. ст., оптимальным считается уровень отрицательного давления в ране -125 мм рт.ст.

Также применяется сочетание дренажно-промывной системы и вакуум-системы – вакуум-промывная терапия, когда дополнительно к описанной VAC-системе подводится приточный дренаж.

В случаях выражено инфицированных ран в гнойных полостях промывание проводится растворами антисептиков и растворами, содержащими антибиотики; при выраженной контактной болезненности раны используются анестетики; с целью создания влажной среды в асептических ранах – раствор Рингера [290].

Вакуум-терапия улучшает течение всех стадий раневого процесса: уменьшает локальный отек, как результат – способствует усилению местного кровообращения, снижает уровень микробной обсемененности раны, вызывает деформацию раневого ложа и уменьшение раневой полости, приводя к ускорению заживления раны. Также вакуум-терапия снижает выраженность раневой экссудации, способствуя поддержанию влажной раневой среды, необходимой для нормального заживления раны. Все эти эффекты способствуют увеличению интенсивности клеточной пролиферации, усиливают синтез в ране основного вещества соединительной ткани и протеинов [291]. Ряд исследований показывает отсутствие в ране микробной биоплёнки уже через сутки использования вакуум-терапии ран [292].

Таким образом, современное понимание биологии существования микроорганизмов позволяет иначе рассматривать процессы, лежащие в основе течения инфекции. Форма существования микроорганизмов в виде биопленок – это выгодный способ организации патогенных, условно-патогенных прокариот при паразитировании макроорганизма. На сегодняшний день образование биоплёнок госпитальными изолятами бактерий является серьезной угрозой для практического здравоохранения. Разрабатываются новые подходы для идентификации и изучения БП,

включая иммунный ответ на инфекции связанные с биоплёнками, меняется тактика применения антибиотиков, а также ведется поиск ингибиторов межклеточной сигнализации, ферментов и других методов разрушения биоплёнок.

## **9. МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ ВОЗДЕЙСТВОВАТЬ НА БИОПЛЕНКУ**

### **9.1 Метод изучения воздействия различных веществ на матрикс биоплёнки, сформированной на мембране из инертного полимера**

Метод изучения влияния различных веществ на матрикс биоплёнки основан на определении оптической плотности высвободившегося в раствор красителя конго красного при разрушении матрикса исследуемым веществом.

Перед изучением воздействия вещества на матрикс биоплёнки последнюю формируют на мембране из инертного полимера как описано выше и окрашивают конго красным.

Для этого мембрану со сформированной БП извлекают из чашки Петри. Биопленку с мембраны смывают стерильным физиологическим раствором. К полученной суспензии добавляют в избытке 0,5 % раствор конго красного. Суспензию дважды отмывают физиологическим раствором для удаления не связавшегося раствора конго красного с осаждением матрикса центрифугированием при 1000 оборотов/минуту (200 g) в течение 75 минут после каждой отмывки. Суспензию замораживают и хранят при  $-25^{\circ}\text{C}$  до использования.

Непосредственно перед проведением эксперимента готовят рабочую суспензию матрикса. Для этого 0,9% раствором NaCl разводят размороженную суспензию матрикса до оптической плотности 2,5  $E_{\text{оп}}$  на многоканальном спектрофотометре при длине волны 492 нм и 0,15 мл суспензии матрикса в лунке 96 луночного планшета для ИФА. Далее 0,1 М раствором фосфатного буфера с pH 7,4 доводят оптическую плотность суспензии до 2  $E_{\text{оп}}$ . Определено, что в 1 мл такой рабочей суспензии должно содержаться 12,2 мг сухого матрикса и 0,1 мг конго красного. В качестве консерванта в суспензию добавляют азид натрия до концентрации 2 мг/мл.

Затем определяют способность агента разрушать матрикс. В пробирку типа «эппендорф» вносят 0,1 мл раствора исследуемого вещества в известной концентрации, 0,3 мл суспензии биопленки и инкубируют 24 часа при  $37^{\circ}\text{C}$ . Реакционную смесь центрифугируют 10 минут при 10 тыс. оборотов в минуту (7930 g) для осаждения неразрушенных элементов биопленки и переносят по 0,15 мл надосадка в лунки планшета для иммуноферментного анализа.

Учет реакции производят по увеличению оптической плотности надосадка на спектрофотометре Ф 300 ТП при длине волны 492 нм за счет высвобождения конго красного при разрушении комплекса красителя с компонентами экзополимерного матрикса. В качестве отрицательного контроля вместо раствора исследуемого вещества используют физиологический раствор. Значения представляются в виде концентрации конго красного (мкг/мл) в пробирке типа «эппендорф».

Для пересчета единиц оптической плотности в мкг/мл выделенного конго красного использовалась формула (квадратный корень-Y модель):

$$X=(0,101 + 11,04*[E_{\text{оп пробы}} - E_{\text{оп контроля}}])^2$$

Выявлено, что при изучении агента с  $\text{pH} \leq 5,5$  происходит изменение цвета конго красного, что затрудняет применение метода для оценки активности растворов веществ с низкой кислотностью [293]. Метод также ограничен в использовании при изучении воздействия различных веществ из-за окраски растворов вследствие разрушения БП.

## 9.2 Метод разрушения матрикса биоплёнки ультразвуком

Для изучения свойств микроорганизмов в составе БП, а также определения количества КОЕ в составе биоплёнки необходимо разрушить матрикс без повреждения бактерий.

Для ультразвукового разрушения матрикса биоплёнки, сформированной на поликарбонатной мембране, последнюю извлекают из чашки Петри, биопленку с мембраны смывают 20% раствором сахарозы на 0,01 М фосфатном буфере с  $\text{pH}$  8,2. Раствор сахарозы используют с целью повышения плотности среды для лучшего проведения ультразвуковых волн. В пенициллиновый флакон вносят 5 мл суспензии биоплёнки. Для разрушения матрикса БП используют аппарат для ультразвуковой хирургии и дезинтеграции тканей «ЛОРА-Дон» со специально разработанным наконечником для работы с пенициллиновым флаконом (рис. 9.1). Для этого наконечник фиксируют к акустическому узлу ультразвукового аппарата с помощью внутренней резьбы. Далее наконечник помещают в пенициллиновый флакон, в котором находится матрикс биоплёнки. Включают аппарат «ЛОРА-Дон» в режиме III однократно на 3 минуты для разрушения матрикса БП. Использование данных режимов позволяет максимально разрушить матрикс биоплёнки без повреждения клеток. Контроль разрушения матрикса биоплёнки проводят с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Наконечник извлекают, отсоединяют от аппарата.

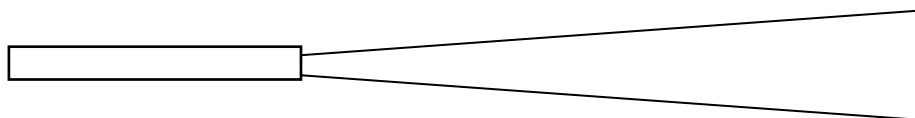


Рисунок 9.1 – Наконечник к ультразвуковому хирургическому аппарату «ЛОРА-Дон»

Применение предлагаемого устройства позволяет стандартизировать методику разрушения матрикса микробных биопленок, сформированных на поликарбонатной мембране [294].

Для разрушения матрикса биоплёнки в лунках полистиролового планшета используют адаптированный, разработанный наконечник к

ультразвуковому хирургическому аппарату «ЛОРА-Дон» и ультразвуковому диспергатору, изображённый на рисунке 9.2.

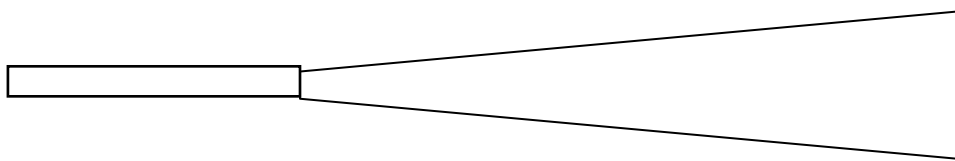


Рисунок 9.2 – Наконечник к ультразвуковому хирургическому аппарату «ЛОРА-Дон» и ультразвуковому диспергатору

Наконечник фиксируют к акустическому узлу с помощью внутренней резьбы. В лунки планшета со сформированной биоплёнкой добавляют по 150 мкл 20% раствора сахарозы на 0,01 М фосфатном буфере с рН 8,2, для повышения плотности среды для проведения ультразвуковых волн. Далее наконечник помещают в лунки планшета. Включают аппарат «ЛОРА-Дон» в режиме III однократно на 30 секунд для разрушения матрикса биопленки. Использование данного режима позволяет максимально разрушить матрикс биопленки без повреждения клеток. Контроль разрушения матрикса БП проводился с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа. Наконечник извлекают, отсоединяют от генератора и обрабатывают дезинфектантом [295].

При использовании ультразвукового диспергатора необходимо выбрать режим непрерывной работы, при мощности 25 Вт однократно на 45 секунд.

### **9.3 Метод определения проникновения антибиотиков через биопленку**

Метод позволяет определять проникновение антибактериальных препаратов через БП, образуемую бактериями – возбудителями гнойно-воспалительных процессов, с целью назначения пациентам рациональной схемы антимикробной терапии.

Предложен способ определения проникновения антибиотиков через биопленку, заключающийся в том, что суточная культура бактерии доводится до определенной концентрации КОЕ/мл по оптической плотности. Биопленку получают следующим способом: 50 мкл полученной бактериальной взвеси добавляют на стерильный поликарбонатный мембранный фильтр диаметром 25 мм, который находится на агаре. Чашки инкубируют в течение 48 часов при 35<sup>0</sup>С. На полученную таким образом 48-часовую биопленку кладут мембрану диаметром 13 мм и смоченный в бульоне диск. Далее БП, образовавшуюся на фильтре, мембрану и диск перемещают на агар с исследуемым антибиотиком. Через сутки диск переносят на агар, содержащий чувствительный к данному антибиотику микроорганизм, инкубируют в течение 18-20 часов, после чего измеряют

зону задержки роста и сравнивают ее с контролем, содержащим две мембраны без биопленки [296]. Недостатками данного метода являются трудоемкость выполнения методики, необходимость использования специальных мембран и фильтров, отсутствие критерия количественной оценки способности биопленки ограничивать проникновение антибиотиков.

Нами разработан метод определения проникновения антибиотика через БП, при котором изолят бактерий выращивают на агаре при 37°C в течение 24 часов. Готовят взвесь микроорганизмов  $0,5$  единиц оптической плотности, определенным с помощью денситометра, что соответствует концентрации  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. На агар в чашку Петри помещают поликарбонатную мембрану с диаметром пор  $0,3$  мкм, на поверхность которой добавляют  $400$  мкл взвеси бактерий, и инкубируют в течение 24 часов. Мембрану с полученной БП переносят на агарозу, содержащую антибиотик, и покрывают слоем чистой поликарбонатной мембраны. Вплотную на чистую мембрану устанавливают пластиковую пробирку с отверстиями на обоих концах, заполненную агарозой. Во время инкубации в течение суток антибактериальный препарат диффундирует через мембраны в столбик агарозы. На расстоянии  $1$  см от края столбика агарозы, прилежащего к мембранам, формируют диск толщиной  $2$  мм и помещают на агар с микроорганизмом. Через сутки определяют зону задержки роста. Контролем служит зона задержки роста, полученная при использовании двух слоев чистой поликарбонатной мембраны. При отличии диаметра зоны задержки роста микроорганизма, образовавшейся с использованием БП, от контрольной на  $3$  и более мм констатируют способность биопленки микроорганизма снижать проникновение антибактериального препарата.

Данный метод позволяет провести качественную оценку способности биопленки снижать проникновение антибактериальных препаратов и с учетом этого назначать рациональную схему антимикробной терапии [297].

#### **9.4 Действие антисептиков на микробные сообщества**

Изучено действие наиболее часто используемых антисептиков на матрикс БП бактерий (*E. coli*, *S. aureus* и *S. oralis*), меченый конго красным (табл. 9.1). Все антисептики исследовались в  $1/2$  дифференцирующей концентрации при экспозиции 30 минут. Обнаружено, что наиболее активным в отношении матрикса биоплёнки *E. coli*, *S. oralis* и *S. aureus*, меченого конго красным, оказался диметилсульфоксид (димексид), соответственно,  $3,83 \pm 0,75$ ,  $16,59 \pm 1,26$  и  $20,47 \pm 0,84$  мкг/мл. Несмотря на существенные различия в активности против БП в зависимости от вида продуцирующего микроорганизма, активность димексида во много раз превышает активность других соединений. Активность равная или близкая к нулевому уровню в отношении матрикса БП, меченого конго красным,

определена у таких антисептиков как 3% перекись водорода, цетилпиридиния хлорид, 2% хлоргексидин биглюконат. Антисептики, у которых не было выявлено активности, в таблицу не включены: септомирин (мирамистин), стоматидин (гексетидин), хлоргексидин биглюконат 0,05%, «Белодез» (гипохлорит натрия 3%), фурацилин и йодиксин. В тоже время «Инол» и изопропиловый спирт, которые обладают относительно высокой активностью против БП, оказывают раздражающее действие на кожу и не используются в качестве антисептиков для обработки ран и ротовой полости. Поэтому только 25% диметилсульфоксид может быть рекомендован с целью лечения пациентов с заболеваниями, ассоциированными с возбудителями, способными формировать биоплёнки.

Таблица 9.1 – Способность антисептиков к разрушению экзополимерного матрикса биопленки *E. coli*, *S. aureus* и *S. oralis*

№ п/п	Антисептик	<i>E. coli</i> М±σ, мкг/мл	<i>S. aureus</i> М±σ, мкг/мл	<i>S. oralis</i> М±σ, мкг/мл
1.	Диметилсульфоксид 25%	3,83 ±0,75	16,59 ±1,26	20,47 ±0,84
2.	Перекись водорода 3%	-	0	0,158±0,01
3.	Цетилпиридиния хлорид	-	-	0,23±0,02
4.	«Белсол» (хлоргексидин биглюконат 2%)	-	0	0,05±0,02
5	«Инол» (73,8% этанол, 3,8% изопропиловый спирт)	-	0,409±0,0002	-
6	Изопропиловый спирт	-	0,9367±0,0005	-
7	«Септоцид-синерджи» (70% этанол, бигуаниды 3,5%)	-	0,120±0,003	-

Также была исследована способность аскорбиновой кислоты и ацетилцистеина разрушать матрикс БП. Активность препаратов составила  $0,13 \pm 0,02$  и  $0,42 \pm 0,04$  мкг/мл соответственно.

Для определения времени экспозиции и концентрации было изучено действие ферментов и антисептиков на протяжении 24 часов. На основании анализа графиков было установлено, что ДНКаза I типа и гиалуронидаза I (бычья) обладают максимальной активностью при экспозиции 20 с в концентрации 1,5 мг/мл и 0,75 мг/мл, соответственно, в то же время активность диметилсульфоксида наибольшая в концентрации 25% и проявляется в первые секунды взаимодействия [298].

## 9.5 Действие ферментов на микробные сообщества

Представляется важным определить какие ферменты, особенно присутствующие в биологических жидкостях человека, способны расщеплять матрикс БП. В связи с этим, мы оценили способность сывороточного альбумина, лизоцима, гиалуронидазы Ia (тестикулярная) и



Ша (стрептококковая) типа, ДНКазы I типа и некоторых других ферментов к расщеплению матрикса БП *S. aureus* и *S. oralis*. Наибольшую способность к разрушению матрикса БП *S. aureus* и *S. oralis* продемонстрировала гиалуронидаза Ia типа, причем эта активность, вероятно, связана с гидролизом  $\beta$ -N-ацетилгексозаминидных связей гиалуроновой кислоты в составе микробного сообщества. За счет различий в составе экзополимерного матрикса БП способность гиалуронидазы Ia типа к его разрушению различна. Менее устойчив матрикс, образуемый *S. aureus*, чем *S. oralis*, а на БП *E. coli*, тестикулярная гиалуронидаза не оказывает значительного разрушительного эффекта. Нормальный человеческий альбумин продемонстрировал высокую способность к разрушению матрикса БП: против БП, образуемой *S. aureus*, *S. oralis* активность оказалась практически одинаковой, а против БП *E. coli* – более низкая. Среди протеолитических ферментов наибольшую активность продемонстрировала протеиназа К, но ее уровень значителен только против БП *S. oralis*, что указывает на различия содержания белков в составе биопленки разных микроорганизмов. Низкий уровень активности лизоцима свидетельствует о незначительной доле или полном отсутствии пептидогликана в составе экзополимерного матрикса БП *S. aureus* и *S. oralis*. Значительные различия в способности к разрушению матрикса биопленки, образуемыми *E. coli*, *S. aureus* и *S. oralis*, демонстрируют и другие ферменты, но учитывая их общий низкий уровень активности, они малопригодны для практического применения (табл. 9.2).

Таблица 9.2 – Способность ферментов к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *E. coli*, *S. aureus*, *S. oralis*

Фермент	<i>E. coli</i> М $\pm\sigma$ , мкг/мл	<i>S. aureus</i> М $\pm\sigma$ , мкг/мл	<i>S. oralis</i> М $\pm\sigma$ , мкг/мл
Альбумин (0,1 мг в пробе)	2,1 $\pm$ 0,46	3,1 $\pm$ 0,22	3,1 $\pm$ 0,41
Трипсин (bovine pancreas)	0,034 $\pm$ 0,0005	0,061 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,06
Пепсин (человеческий)	0,018 $\pm$ 0,004	0,058 $\pm$ 0,019	0,14 $\pm$ 0,029
Альфа-амилаза (porcine pancreas)	0,044 $\pm$ 0,02	0,039 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,08
Гиалуронидаза Ia (тестикулярного типа)	0,056 $\pm$ 0,027	5,86 $\pm$ 0,85	1,66 $\pm$ 0,2
Гиалуронидаза IIIa (стрептококковая)	0,055 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,11	0,1 $\pm$ 0,04
Лизоцим (human)	-	0,0126 $\pm$ 0,0126	0,013 $\pm$ 0,012
Пероксидаза (horseradish)	0,037 $\pm$ 0,023	0,23 $\pm$ 0,13	0,054 $\pm$ 0,06
Протеиназа К (tritrachium album)	0,53 $\pm$ 0,1	0,312 $\pm$ 0,07	2,26 $\pm$ 0,07
Рибонуклеаза (bovine pancreas)	-	0,0126 $\pm$ 0,045	0,014 $\pm$ 0,011
ДНКазы I типа	0,021 $\pm$ 0,004	0,34 $\pm$ 0,14	0,18 $\pm$ 0,1
Папаин (Carica papaya)	0,05 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,007	0

Ферменты, которые показали наибольшие значения активности при расщеплении БП *S. oralis*, были исследованы в комбинации для выявления их возможного сочетанного применения (табл. 9.3). Из полученных данных следует, что при комбинации ферментов происходит снижение их активности [299].

Таблица 9.3 – Влияние комбинации ферментов на способность расщеплять экзополимерный матрикс биопленки *S. oralis*

№, п/п	Фермент	M±σ, мкг/мл
1	ДНКазы I типа + гиалуронидаза Ia типа	0,45±0,02
2	Протеиназа K + гиалуронидаза Ia типа	0,31±0,01
3	Протеиназа K + -ДНКазы I типа	0,13±0,02
4	Протеиназа K + гиалуронидаза Ia типа + ДНКазы I типа	0,086±0,02

## 9.6 Действие антибактериальных препаратов на микробные сообщества

При изучении действия антибактериальных препаратов на способность микроорганизмов формировать БП обнаружено, что при концентрации антибактериального препарата ниже МПК биоплёнка формируется без изменений. При концентрации антибактериального препарата равной или выше МПК значения ОП опытных лунок не отличается от значения отрицательного контроля – биоплёнка не формируется. При исследовании воздействия антибактериальных препаратов на сформированную в полистироловом планшете биоплёнку было обнаружено отсутствие разрушения её матрикса.

Для изучения эффективности применения антибактериальных препаратов проведено сравнение МПК антибиотиков для планктонных форм бактерий и микроорганизмов в составе биоплёнок. Изучены 26 изолятов, способных формировать биоплёнки: 14 изолятов *S.aureus*, 12 изолятов *P.aeruginosa*.

Для адекватного сравнения чувствительности к антибактериальным препаратам планктонных форм бактерий и бактерий в составе биоплёнки сравнивали МПК для сопоставимого количества КОЕ. После анализа полученных данных определено среднее количество КОЕ в биопленке в одной лунке –  $1,5 \cdot 10^8 \pm 0,1 \cdot 10^8$ .

МПК для бактерий в составе БП определена с помощью метода, описанного ранее. В качестве критерия чувствительности изолята к АБ использовались рекомендации Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности (EUCAST, Clinical and Laboratory Standards Institute). Следует отметить, что на сегодняшний день отсутствуют стандарты по тестированию антимикробной резистентности для бактерий в составе биопленки.

Изоляты *S.aureus* оказались наиболее чувствительны к ванкомицину, тигециклину и амикацину (100% чувствительных изолятов), а также к фторхинолонам, моксифлоксацину, левофлоксацину – по 100% чувствительных изолятов, ципрофлоксацину – 93% чувствительных изолятов, ломефлоксацину – 86% чувствительных изолятов. Чувствительность к цефалексину составила 79%, а к цефотаксиму – 72%. Результаты представлены в таблице 9.4.

Таблица 9.4 – Чувствительность клинических изолятов *S.aureus*, планктонные формы

	S, %	I, %	R, %	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>	Ме МПК	Min/max	LQ; UQ
Левифлоксацин	100	0	0	0,1	0,5	0,15	0,05/0,5	0,1; 0,5
Ломефлоксацин	86	7	7	0,5	2	0,48	0,1/5	0,2; 1
Моксифлоксацин	100	0	0	0,1	0,2	0,134	0,1/0,2	0,1; 0,2
Ципрофлоксацин	93	0	7	0,1	0,2	0,15	0,05/8	0,1; 0,2
Цефалексин	79	0	21	0,5	16	1,05	0,25/16	0,25; 8
Цефотаксим	72	0	28	1	16	2,2	0,5/32	1; 16
Амикацин	100	0	0	1	1,5	1,06	0,4/8	0,8; 1,5
Ванкомицин	100	0	0	1	2	0,9	0,5/2	0,5; 2
Тигециклин	100	0	0	0,05	0,05	0,022	0,01/0,05	0,01; 0,05

Изоляты *S.aureus* в составе БП оказались наиболее чувствительны к тигециклину – 100% чувствительных изолятов. Чуть менее чувствительны изоляты в составе биоплёнки оказались к фторхинолонам: ципрофлоксацин – 86%, левофлоксацин – 64%, моксифлоксацин и ломефлоксацин – 43% чувствительных изолятов.

В значительной степени снизилась чувствительность микроорганизмов в составе биоплёнки по сравнению с планктонными формами для амикацина (со 100% до 36% чувствительных изолятов) и ванкомицина (со 100% до 0% чувствительных изолятов). Результаты представлены в таблице 9.5.

Таблица 9.5 – Чувствительность клинических изолятов *S.aureus* в составе биоплёнки

	S, %	I, %	R, %	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>	Ме МПК	Min/max	LQ; UQ
Левифлоксацин	64	21	15	0,5	2,2	0,58	0,2/4,5	1,1; 4,5
Ломефлоксацин	43	0	57	2,2	4,8	2,07	0,6/19	0,25; 1,5
Моксифлоксацин	43	21	36	0,8	2,2	0,58	0,025/3,1	0,5; 1,1
Ципрофлоксацин	86	0	14	1,1	1,5	0,9	0,2/19	0,4; 1,1
Цефалексин	14	0	86	112,5	300	45,8	2,4/600	4,8; 150
Цефотаксим	28	0	72	4,5	128	8,8	0,6/300	1,2; 64
Амикацин	36	28	36	9	19	8,4	0,5/38	4,8; 19
Ванкомицин	0	0	100	19	600	37,6	4,5/600	4,8; 300
Тигециклин	100	0	0	0,5	0,5	0,26	0,1/0,5	0,1; 0,5

Изоляты *P.aeruginosa* оказались наиболее чувствительны к колистину, а так же комбинации пиперациллин+клавуланат (по 92% чувствительных изолятов). В меньшей степени были эффективны фторхинолоны: моксифлоксацин и ципрофлоксацин – 67% чувствительных изолятов, левофлоксацин – 58% чувствительных изолятов.

Наименьшая эффективность в отношении клинических изолятов была выявлена у амикацина – 50% чувствительных изолятов и комбинации цефоперазон+клавуланат – 33% чувствительных изолятов. Результаты представлены в таблице 9.6.

Таблица 9.6 – Чувствительность клинических изолятов *P.aeruginosa*, планктонные формы

	S, %	I, %	R, %	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>	Ме МПК	Min/max	LQ; UQ
Амикацин	50	8	42	8	60	5,75	0,38/100	0,38; 60
Колистин	92	0	8	2	4	1,88	0,5/16	1; 3
Левифлоксацин	58	0	42	0,2	30	1,12	0,09/30	0,14; 24,5
Моксифлоксацин	67	0	33	0,2	16	0,8	0,04/16	0,19; 16
Ципрофлоксацин	67	8	25	0,04	16	0,15	0,005/16	0,02; 8,37
Цефоперазон+ клавуланат	33	0	67	32	128	30	4/128	8; 96
Пиперациллин+ клавуланат	92	0	8	8	16	8,7	4/100	4; 12

Изученные изоляты *P.aeruginosa* в составе биоплёнки оказались резистентными ко всем изученным антибактериальным препаратам, что указывает на высокие защитные функции БП, и объясняет частое отсутствие эффективности применения данных антибиотиков в клинической практике. Результаты представлены в таблице 9.7.

Таблица 9.7 – Чувствительность клинических изолятов *P.aeruginosa* в составе биоплёнки

	S, %	I, %	R, %	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>	Ме МПК	Min/max	LQ; UQ
Амикацин	0	0	100	100	500	92	16/500	46,5; 162,5
Колистин	0	0	100	32	128	28,5	8/128	12; 48
Левифлоксацин	0	0	100	50	100	41,7	6/400	25; 75
Моксифлоксацин	0	0	100	62	200	61,3	16/500	40,5; 62
Ципрофлоксацин	0	0	100	62	200	38,5	2/500	12; 162
Цефоперазон+ клавуланат	0	0	100	800	800	800	400/800	800; 800
Пиперациллин+ клавуланат	0	0	100	800	800	800	800/800	800; 800

При сравнении МПК<sub>90</sub> *S.aureus* в составе биоплёнки обнаружено, что их резистентность к АБ выросла от 2,5 до 300 раз для изученных антибиотиков по сравнению с планктонными формами. Результаты представлены на рисунке 9.3.

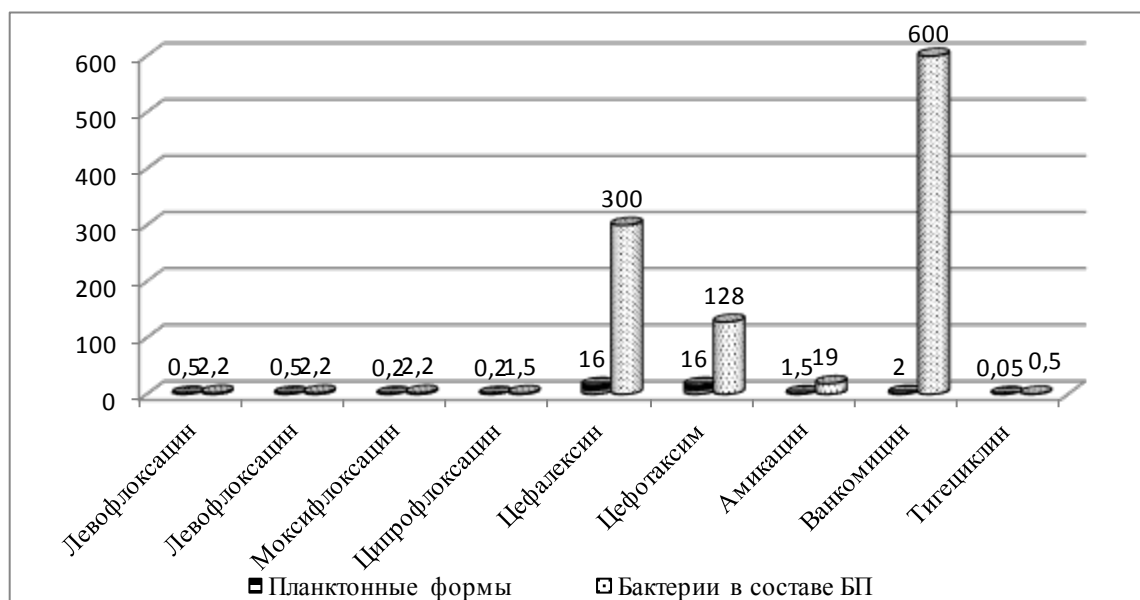


Рисунок 9.3 – МПК<sub>90</sub> планктонных форм *S. aureus* и бактерий в составе биоплёнки к АБ

При изучении процента чувствительных изолятов *S. aureus* в составе БП к АБ выявлено снижение чувствительности бактерий ко всем исследованным АБ относительно их планктонных форм, кроме тигециклина. Результаты представлены на рисунке 9.4.



Рисунок 9.4 – Чувствительность к АБ планктонных форм *S. aureus* и *S. aureus* в составе БП

При сравнении МПК<sub>90</sub> *P.aeruginosa* в составе биоплёнки к АБ обнаружено, что резистентность микроорганизмов выросла от 3,5 до 50 раз для изученных АБ по сравнению с их планктонными формами. Результаты представлены на рисунке 9.5.

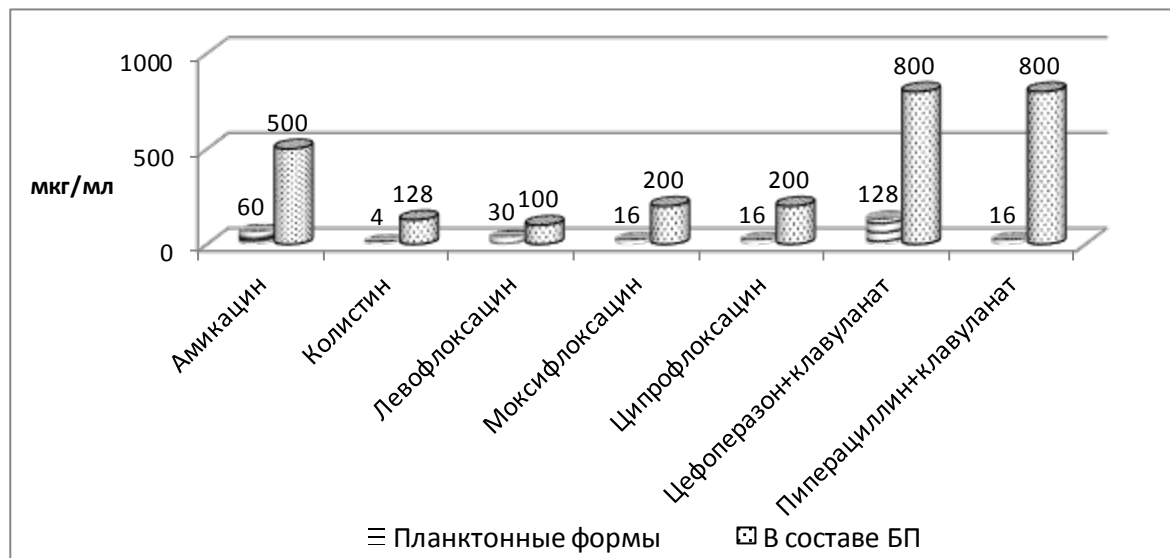


Рисунок 9.5 – МПК<sub>90</sub> планктонных форм *P.aeruginosa* и бактерий в составе БП к АБ

При анализе зависимости резистентности к АБ от толщины БП выявлена достоверная сильная положительная корреляция между толщиной сформированной биоплёнки и количеством антибактериальных препаратов, к которым микроорганизм резистентен ( $r=0,72$ ,  $p<0,05$ ). Также обнаружена достоверная положительная корреляция между толщиной биоплёнки и значением МПК для амикацина ( $r=0,61$ ,  $p<0,05$ ), левофлоксацина ( $r=0,77$ ,  $p<0,05$ ), ципрофлоксацина ( $r=0,69$ ,  $p<0,05$ ) и моксифлоксацина ( $r=0,72$ ,  $p<0,05$ ).

При оценке чувствительности планктонных форм *S.aureus* к антибактериальным препаратам выявлено, что количество чувствительных к моксифлоксацину и левофлоксацину изолятов оказалось больше, чем к ципрофлоксацину, однако при определении процента чувствительных изолятов *S.aureus* в составе биопленки, количество чувствительных к моксифлоксацину и левофлоксацину микроорганизмов оказалось в 2 раза меньше, чем к ципрофлоксацину.

Таким образом, при определении чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам с помощью принятых методик не учитывается возможность формирования изолятом биоплёнки. Последнее может привести к методическим ошибкам, когда на чувствительность бактерий могут повлиять защитные факторы сформированной биоплёнки [300, 301, 302].

## 9.7 Действие факторов иммунитета на микробные сообщества

С целью изучения гуморального иммунного ответа макроорганизма на БП изучено влияние сывороток крови и иммуноглобулинов на матрикс БП (табл. 9.8).

Таблица 9.8 – Способность сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. aureus*

Группа	N	Me (LQ;UQ), мкг/мл
1. Хронические гнойно-воспалительные процессы	13	9,5 (7,2;14,8)
2. Распространенные острые гнойно-воспалительные процессы	11	7,4 (5,1;9,1)
3. Локальные острые гнойно-воспалительные процессы	10	15,2 (9,4;17,8)
4. Тяжелые пневмонии	10	7,2 (2,5;10,3)
5. Доноры	21	12,3 (11,5;16,2)

Примечание: достоверность отличий  $p_{1-5}<0,05$ ,  $p_{1-4}<0,05$ ,  $p_{2-3}<0,01$ ,  $p_{2-5}<0,001$ ,  $p_{4-3}<0,01$ ,  $p_{4-5}<0,001$

При исследовании способности сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс БП *S. aureus* в опытных группах между собой и донорами оказалось, что наименьший уровень активности наблюдался у сывороток пациентов с локальными острыми распространенными гнойно-воспалительными процессами и в группе пациентов с тяжелыми пневмониями. Результаты оценки способности сывороток разрушать матрикс БП *P.aeruginosa*, в целом, имели ту же тенденцию, что и результаты, полученные для БП *S.aureus*. При сравнении данных в группах пациентов получены сходные результаты с результатами при реакции с матриксом БП, образованной стафилококком. Результаты представлены в таблице 9.9.

Таблица 9.9 – Способность сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс биопленки *P.aeruginosa*

Группа	N	Me (LQ;UQ), мкг/мл
1. Хронические гнойно-воспалительные процессы	8	12,7 (10,8;13,4)
2. Распространенные острые гнойно-воспалительные процессы	5	12,1 (7,6; 14,9)
3. Локальные острые гнойно-воспалительные процессы	8	15,5 (11,7;17,7)
4. Тяжелые пневмонии	9	10,6 (6,12;11,3)
5. Доноры	13	15,5 (13,9; 17)

Примечание: достоверность отличий  $p_{1-5}<0,05$ ,  $p_{1-4}<0,05$ ,  $p_{4-3}<0,005$ ,  $p_{4-5}<0,001$

При анализе результатов выявлена достоверная корреляция уровней активности сывороток по отношению к матриксу БП *S. aureus* и *P. aeruginosa* в группе практически здоровых людей и в совокупности пациентов 1, 2, 3, 4 групп. В отдельных опытных группах такой корреляции обнаружить не удалось. При сопоставлении способности сывороток крови к разрушению экзополимерного матрикса БП и клинико-

лабораторными проявлениями заболеваний в группе пациентов с локальными гнойно-воспалительными процессами выявлены достоверные ( $p<0,01$ ) сильные отрицательные корреляции с длительностью гипертермии ( $r=-0,76$ ,  $n=10$ ) и с площадью раневого дефекта ( $r=-0,73$ ,  $n=10$ ). В других группах достоверных корреляций не обнаружено. Не обнаружено связи уровня способности сыворотки к расщеплению БП с видом микроорганизма, вызвавшего гнойно-воспалительный процесс, полом и возрастом пациента. Полученные данные свидетельствуют о том, что способность сывороток крови к разрушению матрикса биопленок является одним из факторов гуморальной неспецифической резистентности, снижение которого способствует развитию инфекционных процессов.

Выборочно выполнено определение способности сывороток крови расщеплять суспензии матрикса БП после прогревания при температуре  $56^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа для инактивации системы комплемента. Оказалось, что активность сывороток при этом достоверно не снижалась (от  $13,31\pm 4,25$  мкг/мл до  $15,32\pm 4,61$  мкг/мл;  $p>0,05$ ), что свидетельствует о незначительном влиянии активации системы комплемента по альтернативному пути на расщепление матрикса БП. В результате проведенного исследования установлено, что препараты иммуноглобулинов доноров и пациентов с хирургической инфекцией способны расщеплять экзополимерный матрикс БП *S. aureus*. Максимальная активность IgG наблюдалась в группе пациентов с тяжелыми пневмониями –  $0,111$  ( $0,032; 0,227$ ) мкг/мл, где она была достоверно выше, чем в группах пациентов с хроническими –  $0,032$  ( $0; 0,071$ ) мкг/мл и распространенными гнойно-воспалительными процессами –  $0$  ( $0; 0,054$ ) мкг/мл. В целом, активность IgG была не очень высокая. Результаты представлены в таблице 9.10. Не обнаружено корреляций способности IgG к расщеплению матрикса БП *S. aureus* с клинико-лабораторными проявлениями заболеваний. Выявлено, что у IgG пациентов с инфекционным процессом, у которых был выделен в качестве возбудителя *S. aureus*, уровень способности разрушать матрикс БП –  $0$  ( $0; 0,028$ ) мкг/мл был достоверно ( $p<0,01$ ) ниже, чем у IgG пациентов, у которых была выделена другая микрофлора –  $0,04$  ( $0,018; 0,09$ ) мкг/мл.

Таблица 9.10 – Способность IgG разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. aureus*

Группа	N	Me (LQ;UQ), мкг/мл
1. Хронические гнойно-воспалительные процессы	10	0,032 (0;0,071)
2. Распространенные острые гнойно-воспалительные процессы	9	0 (0;0,054)
3. Локальные острые гнойно-воспалительные процессы	8	0,036 (0;0,071)
4. Тяжелые пневмонии	7	0,111(0,032;0,227)
5. Доноры	22	0,04 (0;0,118)

Примечание: достоверность отличий  $p_{1-4}<0,05$ ,  $p_{2-4}<0,01$ , между остальными группами достоверных отличий не выявлено ( $p>0,05$ )



Определена также способность препаратов поликлональных иммуноглобулинов G расщеплять экзополимерный матрикс биопленок псевдомонад.

В результате было выявлено, что у пациентов с хирургической инфекцией способность IgG расщеплять экзополимерный матрикс БП *P.aeruginosa* оказалась достоверно ниже ( $p<0,01$ ), чем у доноров, соответственно, 0,01 (0; 0,012) мкг/мл,  $n=31$  и 0,07 (0,04; 0,1) мкг/мл,  $n=15$ . При делении пациентов на группы с острой и хронической хирургической инфекцией уровень активности препаратов иммуноглобулинов G в обеих группах был достоверно ниже, чем в группе доноров (табл. 9.11).

Таблица 9.11 – Уровень активности иммуноглобулинов расщепляющих экзополимерный матрикс *P.aeruginosa*

Группа	N	Me (LQ;UQ), мкг/мл
1.Острая хирургическая инфекция	21	0,035 (0;0,126)
2.Хроническая хирургическая инфекция	10	0,015 (0;0,04)
3. Доноры	15	0,077(0,049;0,104)

Примечание: достоверность отличий  $p_{1-3}<0,001$ ,  $p_{2-3}<0,01$ ,  $p_{1-2}>0,05$

Полученные данные подтверждаются количеством в группах пациентов препаратов иммуноглобулинов G с достоверно положительной активностью, то есть уровнем активности достоверно превышающим уровень спонтанного распада субстрата в контрольных пробах. В группе доноров достоверно положительная активность выявлена в препаратах иммуноглобулинов G 14 человек из 15, что достоверно выше ( $p<0,001$ ), чем у пациентов с хирургической инфекцией – 10 проб из 21.

При сравнении активности иммуноглобулинов G в группах пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией в первой группе она оказалась значительно выше 0,035 (0;0,126) мкг/мл, чем у пациентов с хроническими процессами 0,015 (0;0,04), но это отличие было не достоверным ( $p>0,05$ ). Полученные данные подтверждаются процентным соотношением пациентов с достоверно положительной активностью иммуноглобулинов при хронической инфекции 1 из 10 и острой – 9 из 21 ( $p<0,05$ ). При сравнении отдельно групп пациентов с острой и хронической хирургической инфекцией количество препаратов IgG с достоверно положительной активностью в обоих случаях было достоверно ниже, чем в группе доноров (соответственно,  $p<0,01$  и  $p<0,0001$ ). Отсюда вероятно предположить, что сниженный уровень активности является предрасполагающим фактором для развития инфекционного процесса, поскольку при этом снижается доступность бактерий, образующих БП, для факторов иммунной системы и лекарственных средств, что облегчает процесс инвазии и агрессии микроорганизма.

Таким образом, при исследовании способности сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс БП *S. aureus* оказалось, что она была

достоверно ( $p < 0,01$ ) ниже у пациентов с гнойно-воспалительными процессами, чем у доноров. Та же закономерность отмечалась при изучении воздействия на биопленку *P.aeruginosa*. У пациентов с инфекционными процессами уровень активности сыворотки крови был достоверно ( $p < 0,01$ ) ниже, чем у доноров, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что способность сывороток крови к разрушению матрикса биопленок является одним из факторов гуморальной неспецифической резистентности, снижение которого способствует развитию инфекционных процессов [299].

## 10. КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЁНОК МИКРООРГАНИЗМАМИ-ВОЗБУДИТЕЛЯМИ

На сегодняшний день уже достоверно установлена роль БП в развитии как минимум 60% случаев хронических и/или рецидивирующих инфекций [303]. Тем не менее, относительно недавно интерес к биопленкам ограничивался лишь областью стоматологических проблем (зубной налет как причина кариеса и периодонтита) и аспектов, связанных с их образованием на поверхностях оборудования, предметах медицинского назначения, особенно для инвазивных процедур (эндоскопы, аппараты искусственной вентиляции легких, сосудистые, диализные и мочевые катетеры), и на имплантируемых устройствах, таких как ортопедические и сосудистые протезы, стенты, шовный материал [38].

В настоящее время активно изучаются другие виды биопленок [304, 305], образованные при типичных инфекционных процессах на биологических поверхностях, таких как слизистые оболочки или эпителиальные выстилки внутренних полостей (отит, перитонит, плеврит), а также поверхностные или глубокие ткани организма. С клиническими проявлениями последних из перечисленных случаев встречаются хирурги, которые занимаются лечением инфицированных ран, гнойного перитонита или плеврита, когда различные методы механического очищения инфицированной поверхности играют, пожалуй, основную роль в успехе лечения. Этот пример также наглядно иллюстрирует значение типа субстратов макроорганизма (фибрин и другие белки свертывающей системы крови, секрет желез слизистых, некротизированные ткани) и степень его вовлечения в формирование БП для адекватного выбора способа разрушения последней. Проблема профилактики и терапии гнойных ран при наличии на их поверхности биопленок не может решаться использованием высокоэффективных дезинфектантов, простым повышением концентраций антисептиков или увеличением времени их экспозиции.

Набор критериев для подтверждения связи между формированием биоплёнки и заболеванием человека предложен M.R. Parsek и P.K. Singh в 2005 году [306]: исследование инфицированной ткани с использованием прямых методов (бактериологического, иммунофлуоресцентной микроскопии, сканирующей электронной микроскопии, методики флуоресцентной гибридизации *in situ*); выявление патогенных бактерий в микробных сообществах; наличие очаговой патологии в области микробных скоплений; отсутствие эффективности антимикробной терапии при наличии чувствительности выделенных культур *in vitro*.

Инфекционно-воспалительные заболевания верхних дыхательных путей и ЛОР-органов являются одними из самых распространенных заболеваний человека. Несмотря на свою острейшую актуальность и пристальное внимание не только со стороны профильных врачей, но и других специалистов, включая клинических эпидемиологов,

микробиологов и фармакологов, некоторые проблемы терапии остаются неразрешенными. Речь идет о хронических и рецидивирующих формах отита, риносинусита и тонзиллита, а также о таких состояниях, как экссудативный отит, холестеатома или муковисцидоз [304]. Благодаря применению высокоточных методов молекулярной диагностики наряду с современными возможностями визуализации микрообъектов в последнее десятилетие удалось установить, что культурально-негативный экссудативный отит с отореей является на самом деле активным инфекционным процессом, сопряженным с образованием биопленок на слизистой барабанной полости. Причем БП определяются на барабанной перепонке даже во время клинической ремиссии заболевания у пациентов с персистирующей отореей. Аналогичная картина наблюдается и при хроническом отите, когда возбудитель заболевания может быть выделен из экссудата традиционными методами не более чем в 30% случаев [307].

Хронический риносинусит по современным представлениям также является заболеванием, ассоциированным с биопленками [309], которые довольно часто обнаруживаются в тканях околоносовых пазух (по некоторым наблюдениям – до 72% случаев). В то же самое время у пациентов контрольной группы без клинических проявлений заболевания отсутствуют БП. Исследование удаленной аденоидной ткани детей, страдающих риносинуситом и/или хроническим отитом, выявило биопленки в 94,9% образцов в сравнении с 1,9% случаев при аденоидэктомии, обусловленной обструктивным апноэ, что свидетельствует в пользу выраженной корреляции между биопленками и инфекционно-воспалительным процессом [309]. Установлено, что БП в криптах миндалин способны создавать как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, а среди последних особенно часто – *H. influenzae* [310].

В стоматологии и челюстно-лицевой хирургии важную роль играют микробные биопленки, которые ответственны за этиологию кариеса, заболевания окружающих зуб тканей, воспалительные процессы челюстно-лицевой области и шеи [311, 312, 313, 314, 315].

Исследования показали, что чистые культуры *E. faecalis*, внесенные в корневой канал зуба, способны формировать биопленку на его стенках. Установлено, что даже после эндодонтического лечения в каналах обнаруживаются данные микробные сообщества [316, 317]. При заболеваниях периодонта микробные биопленки определяются в области периапикальных абсцессов, гранулем и кист в 83%, 69,5% и 95% наблюдений, соответственно [318]. Признано, что наддесневая биопленка состоит преимущественно из грамположительных микроорганизмов: *S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *Lactobacillus spp.*; в то время как поддесневая – из грамотрицательных: *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*. В обоих случаях сообщества клеток могут создавать высокие

концентрации метаболитов, например, кислот, аммиака, пероксида водорода, оксидантов, диоксида углерода и др., которые влияют как на видовой состав внутри микроколонии, так и на организм в целом [319].

Главным фактором риска в развитии перимплантита является недостаточная гигиена полости рта после проведения дентальной имплантации. Функционирование имплантатов сопровождается развитием биопленок на внекостных поверхностях имплантата. Их микробная флора схожа с флорой периодонтальных карманов при периодонтите. Образующаяся БП способна вызывать хроническое продуктивное воспаление и привести к перимплантиту [320].

Способность формировать микробные сообщества выявлена у изолятов, выделенных из субпериостального абсцесса [321]. В области инфекционно-воспалительного очага у пациентов с глубокими абсцессами шеи определены микробные биопленки [322].

Закономерным явлением представляется наблюдение, что основной возбудитель заболевания, ассоциированного с образованием биопленок, как правило, является и продуцентом собственно биопленок. Так, для кариеса и периодонтита биопленкообразующими возбудителями будут грамположительные кокки и грамотрицательные анаэробы, такие как *S.mutans*, *S.mitis*, *S.sanguis*. Для среднего отита таким возбудителем является гемофильная палочка. При инфекциях билиарного тракта и простатите биопленки образуют энтеробактерии, преимущественно – *E.coli*. Биопленки при некротизирующем фасциите, инфекциях опорно-двигательного аппарата ассоциированы с *S.pyogenes* и другими грамположительными кокками. Возбудители инфекций, связанных с контаминацией имплантируемых устройств и предметов для инвазивного использования, также не уникальны и представляют в своем большинстве обитателей соответствующих биотопов или возбудителей типичных для данной области инфекций. Актуальность проблемы протезного инфекционного эндокардита и участия БП в развитии инфекций, связанных с другими имплантатами, растёт пропорционально развитию кардиохирургии и потребности в различных синтетических материалах, клапанах, биопротезах [323]. Теоретически очевидно, что для микроорганизмов экологически выгодно прикрепление к материалу протезного клапана и использование прилегающей к нему ткани в качестве источника питания. В то же время у большинства пациентов с протезами клапанов сердца и другими имплантатами, благодаря неизвестным пока механизмам, случайно прикрепившиеся бактерии в этом локусе достаточно пассивны. Вероятно, формируются симбиотические отношения, которые не приводят к активному размножению бактерий и, соответственно, препятствуют развитию воспалительной реакции [324]. Необходимость изучения экологических условий возникновения и существования микробных БП на фазовой границе между абиогенной поверхностью механических протезных клапанов и тканями сердца несомненна. После создания адекватной модели *in vitro* будет возможен экспериментальный

поиск новых методов профилактики и лечения.

Формирование биопленок возможно на изделиях медицинского назначения, таких как катетеры, эндотрахеальные трубки, внутриматочные спирали, контактные линзы и др. [325, 326]. Это является этиопатогенетической основой развития так называемых девайс-ассоциированных инфекций. В Германии, одной из немногих стран, где ведется статистический учет девайс-ассоциированных инфекций, количество подобных заболеваний превышает 100000 случаев в год [327]. В США и Западной Европе ежегодно регистрируется более 500000 случаев катетер-ассоциированных инфекций [328]. Каждое осложнение в виде катетер-ассоциированной инфекции удорожает лечение одного пациента на сумму от 33000 до 65000 долларов США [329]. В итоге на лечение и борьбу с осложнениями биопленочных катетер-ассоциированных инфекций система здравоохранения США вынуждена тратить около 2 миллиардов долларов в год [330, 331]. Показано, что биоплёнки на катетерах, установленных на сроки менее 10 дней, формируются в основном на внешней поверхности катетера, а у катетеров, установленных на более длительные сроки (10-30 дней) – на внутренней. Поскольку катетер находится в прямом контакте с кровяным руслом, его поверхность покрывается форменными элементами крови и белками (альбумин, фибриноген, фибронектин), что облегчает адгезию микроорганизмов.

В последние десятилетия, благодаря исследованиям ученых в разных областях науки, удалось в значительной мере выяснить причины частой неэффективности антимикробной терапии инфекционных осложнений, возникающих в ортопедической имплантологии крупных суставов. Во многом это связывают со способностью микробных возбудителей параэндопротезной инфекции формировать на имплантатах биопленки. Существование возбудителей в составе биопленок затрудняет диагностику имплант-ассоциированной инфекции и снижает эффективность антибактериальной терапии. При обследовании пациентов с наличием эндопротеза или других металлоконструкций низкая информативность дооперационной бактериологической диагностики параэндопротезной инфекции обусловлена тем, что в исследуемом аспирате могут отсутствовать планктонные формы возбудителя, тогда как на поверхности имплантата сформирована биопленка с прочно внедренными в нее инфекционными агентами [332]. Стафилококки, возбудители ортопедической имплант-ассоциированной инфекции, в 40,9% случаев являются сильными биопленкообразователями [333].

В результате исследований показано, что способность *S. epidermidis* образовывать БП является мощным фактором вирулентности, определяющим на сегодняшний день его ведущее этиологическое значение в имплант-ассоциированных инфекциях [334, 335].

Изучение вероятной роли биопленок в хроническом бактериальном простатите проводится с применением модели на животных [336] или путем исследования образцов, взятых при биопсии простаты у мужчин с

простатитом [337]. В ходе одного из исследований были получены биоптаты простаты мужчин с хроническим бактериальным простатитом и высеяны на чашки с питательным агаром. Так же с помощью электронной микроскопии были изучены гистологические образцы. Установлено наличие бактериальных ассоциатов на стенках протоков, что особенно было характерно для *P. aeruginosa*. Авторами продемонстрированы в пункционных биоптатах спорадические микроколонии КОС во внутрипротоковом пространстве, которые были окутаны обезвоженной матрицей слизи [338]. В связи с чем высказано предположение, что неэффективность лечения, распространенная при простатите, связана с образованием биопленок. Как только бактерии попадают в простату, они продуцируют гликокаликс и становятся неактивными, что может объяснить большую устойчивость к антимикробным средствам [339]. В своей работе J. C. Nickel и J. W. Costerton [340] показали, что у пациентов с хроническим бактериальным простатитом при пролонгированной антибиотикотерапии сохраняются симптомы заболевания. Режимы дозирования этих антибиотиков были определены в результате культивирования и тестирования антибиотикочувствительности в лабораторных условиях. Обнаружено, что бактерии из разрушенных ультразвуком клеток биоптатов культивировались значительно дольше (96 часов), чем бактерии, выделенные от пациентов с циститом. Данное наблюдение подтверждает точку зрения, что микроорганизмы, растущие в биопленках, отличаются измененным метаболизмом. Поэтому J. C. Nickel и соавторы [339] настаивают на необходимости применения более высоких доз антибиотиков для воздействия на бактерии, образующие биопленки, в просвете предстательных протоков [341].

Биопленки могут осложнять течение заболеваний почек. Планктонные бактерии могут достигать почек восходящим путем и способны прикрепляться к уроэпителию и почечным сосочкам в почечных собирательных системах. Бактериальная адгезия является основным моментом в колонизации тканевых поверхностей организма-хозяина. Адгезия микроорганизмов к уроэпителию дает им возможность противостоять удалению потоком мочи. Бактериальная адгезия не только способствует колонизации, но также благоприятствует инвазии микроорганизмов, формированию биопленок и повреждению клеток хозяина с развитием пиелонефрита. Биопленки на поверхности уроэпителия легче поддаются эрадикации антимикробными агентами по сравнению с БП, которые образуются на чужеродных объектах, находящихся в мочевыделительной системе. Инородное тело в мочевых путях (катетеры, стенты, дренажи, камни) становится очагом инфекции для организма, что приводит к развитию осложненных инфекций мочевыделительной системы [342]. Периодическое высвобождение планктонных форм бактерий из БП в поток мочи служит источником поддержания хронического инфекционного и воспалительного процесса в почках. Бактерии, инфицирующие мочевыводящие пути, не только

поддерживают хроническую инфекцию за счет повышенной устойчивости биопленок к терапии, но и способствуют камнеобразованию. Инфекция, локализуемая как в почечной ткани, так и в мочевых путях, является важным патогенетическим звеном в камнеобразовании при мочекаменной болезни. За счет изменения защитного слоя уроэпителия и формирования на нем микробных БП в 5–6 раз увеличивается адгезия струвитных кристаллов. Роль уреазопродуцирующих бактерий (*Proteus spp.*, *Ureaplasma urealyticum*, *Providencia spp.*, *Klebsiella spp.*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*) в генезе нефролитиаза заключается в том, что под воздействием бактериальной уреазы расщепляются молекулы мочевины с образованием аммиака. Это приводит к изменению кислой реакции мочи на щелочную, то есть происходит ощелачивание мочи. Реакция мочи имеет существенное значение в образовании камней. При щелочной реакции мочи замедляется растворимость кристаллических элементов и создаются благоприятные условия для выпадения их в осадок. При этом происходит оседание струвита (магния аммония фосфат и карбонат кальция) и апатита (соли фосфорных кислот), заключенных в экзополимерном матриксе в биопленке. Таким образом, микробные БП способствуют кристаллизации конкрементов из мочи [343, 344, 345].

В исследовании Лагун Л. В. и соавторов показано, что среди возбудителей как острых, так и хронических пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*. Изоляты *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, выделенные от пациентов с хроническим пиелонефритом, по способности формирования биопленок превосходили изоляты, выделенные от пациентов с острым пиелонефритом. Интенсивное образования биопленок клиническими изолятами *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* является важным фактором хронизации инфекций мочевыделительного тракта [345].

У пациентов с постоянным уретральным катетером часто возникают различные осложнения: острый пиелонефрит, цистит, эпидидимит, абсцессы простаты, бактериемия, септицемия, стриктуры уретры, в связи с чем смертность в этой группе увеличивается почти в 3 раза, а у пациентов со спинальными повреждениями этот показатель достигает 20–40% [346]. С момента установки внутренняя и наружная поверхности уретрального катетера становятся мишенью для формирования БП. При экстралюминарном пути инфицирования микроорганизмы распространяются восходящим путем по уретре во время и после установки катетера. Бактериальные биопленки могут также развиваться на внутренних стентах, установленных в верхние мочевые пути. Показано, что 68–90% мочеточниковых стентов колонизируются, в то время как бактериурия имеет место только у 27–30% пациентов со стентами [347, 348]. Этот факт обуславливает трудность выявления биопленок. Тем не менее отрицательный культуральный анализ мочи не исключает возможности колонизации стента. Инфекция, развивающаяся на пенильных протезах, чаще всего вызвана стафилококками, в особенности



*S.epidermidis*, которые имеют повышенную способность продуцировать гликокаликс биопленки [349].

Большинство бактерий в желудочно-кишечном тракте существует в виде биоплёнок, такие популяции также названы матрикс-закрытыми микробными сообществами. ЖКТ представляет собой идеальную среду для адгезии, колонизации микроорганизмов и образования биоплёнок благодаря наличию питательных веществ и физико-химических факторов. Исследования верхних отделов ЖКТ указывают, что они негусто заселены микроорганизмами, но при этом наблюдается разнообразие их видового состава. К наиболее изученной теме относится роль *H.pylori* в патогенезе заболеваний гастродуоденальной зоны. По данным эпидемиологических исследований, инфекция, вызванная *H.pylori*, относится к наиболее распространённым инфекциям в мире. С колонизацией слизистой оболочки желудка данным микроорганизмом связывают развитие гастрита, дуоденита, язвенной болезни желудка, двенадцатиперстной кишки и злокачественных новообразований желудка. Большой научный интерес представляют в настоящее время вопросы взаимодействия *H.pylori* с желудочной микробиотой и его участие в формировании биоплёнок. R.M. Stark и соавторы предположили возможность формирования биоплёнки *H. pylori* на поверхности среды при повышенном содержании углекислого газа [350]. Способность этой бактерии формировать биоплёнку не связана с гидрофобностью клеточной стенки, подвижностью и аутоагрегацией, но является изолят-зависимым признаком [351].

*H. pylori* может колонизировать и образовывать биоплёнку благодаря способности к адгезии к различным неорганическим поверхностям. Биоплёнки, образующиеся в распределительных системах водоснабжения, могут служить резервуаром *H. pylori* и иметь эпидемиологическое значение [352]. Персистенция *H. pylori* в БП может быть одним из факторов инфицирования населения через питьевую воду, что указывает на необходимость разработки унифицированных методов детекции этого микроорганизма в воде. Полученные данные могут иметь значение не только для расшифровки отдельных механизмов патогенеза заболеваний человека, но и иметь важное эпидемиологическое значение для разработки методов борьбы с биоплёнками, колонизирующими искусственные системы (водопроводные сети, дуоденальные зонды, интубационные трубки, зонды для назогастрального кормления).

Исследования по изучению формирования биоплёнок *H. pylori in vivo* были проведены при изучении биоптатов слизистой оболочки желудка с использованием прямых визуализирующих методов [353]. По результатам J.M. Coticchia и соавторов установлено, что у пациентов с язвенной болезнью желудка биоплёнка покрыта уреазоположительными бактериями *H.pylori* в 97% случаев [354]. В случаях формирования биоплёнок эрадикационная квадротерапия оказывается неэффективной, хотя в тестах *in vitro* культуры *H.pylori* проявляют чувствительность к используемым препаратам.

Еще одним примером формирования БП при заболеваниях ЖКТ может быть синдром Барретта, при котором наблюдается корреляция между очаговым разложением нитратов нитрат-редуцирующими бактериями, такими как *Veillonella* и *Campylobacter*, входящими в состав биоплёнки, и метапластическими изменениями эпителия пищевода [355]. S.L. Wang и соавторы описали бактериальные сообщества, связанные с воспалительными заболеваниями кишечника, и положительный эффект при лечении антибиотиками в случаях деструкции этих популяций [356]. Swidsinski и соавторы продемонстрировали феномен повторной колонизации слизистых оболочек ЖКТ биоплёночными бактериями, сохранившими жизнеспособность после антибиотикотерапии, и развития рецидивов воспалительных заболеваний кишечника, таких как болезнь Крона и язвенный колит [357, 358].

По мнению современных авторов основным источником нозокомиальных инфекций и фактором персистенции их возбудителей в госпитальных экосистемах, от воздуха и воды до внутренней поверхности катетеров и систем организма, являются биопленки. Первостепенная важность БП как основного источника нозокомиальных инфекций инициирует необходимость тщательного анализа этой проблемы [359].

Основная доля изолятов, выделенных у пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии, характеризующихся наиболее выраженной пленкообразующей способностью, изолирована из мокроты пациентов с острой сердечной и дыхательной недостаточностью, которым проводили реанимационные мероприятия, в том числе искусственную вентиляцию легких. В подобных случаях нарушения мукоцилиарного транспорта в послеоперационном и посттравматическом периодах могут препятствовать элиминации не только возбудителей, но и транзитной оппортунистической микрофлоры, создавая условия для их закрепления и персистирования. В этой группе представлены изоляты, выделенные с поверхности катетеров и трахеобронхиальных трубок, биопленкообразующая активность которых связана со способностью к неспецифической адгезии на имплантируемых устройствах в сочетании с механизмами специфическими – некоторые белки плазмы крови комплиментарны адгезинам синегнойной палочки. В других отделениях чаще всего высокая и умеренная биопленкообразующая способность встречается у изолятов, изолированных из мокроты, трахеобронхиального отделяемого. Все изоляты, выделенные из смывов с поверхности катетеров, отделяемого глаз новорожденных, обладали пленкообразующей способностью. Реже всего эти изоляты встречались в содержимом кишечника и отделяемом из носа. Широкое распространение пленкообразующей способности у псевдомонад, как правило, сочеталось со значительной вариабельностью степени проявления этого признака. Наиболее высокие показатели способности к формированию БП были выявлены у изолятов, изолированных из раневого отделяемого, мокроты, смывов с катетеров. Несмотря на то, что все культуры, выделенные из глаз,

оказались пленкообразующими, выраженность этого признака была невысокой [360].

Приблизительно половина из двух миллионов случаев нозокомиальной инфекции, ежегодно регистрируемых в США, связаны с имплантируемыми устройствами. Инфекции, связанные с постоянными имплантатами, развиваются с большей вероятностью и сложнее в лечении, поскольку требуют длительных курсов антибиотикотерапии и многократных хирургических вмешательств. Хирургический шовный материал также может рассматриваться как имплантат, а его бактериальное загрязнение повышает риск инфицирования макроорганизма. Покрытие имплантатов и шовного материала антибактериальными средствами широкого спектра действия, такими как триклозан, может помочь в снижении частоты хирургических раневых инфекций, особенно при протезировании и загрязненных операциях, и может служить дополнением к терапии антибиотиками, уменьшая злоупотребление последними. Имплантаты используются в ортопедии, в качестве сосудистых/коронарных стентов, пейсмекеров, тканевых трансплантатов и шунтов, в косметической и челюстно-лицевой хирургии. Шовный материал, как и большинство других имплантатов, имеет неотделяемую поверхность, к которой могут прикрепляться бактерии, образуя биопленки и тем самым усиливая хирургическую раневую инфекцию.

В одном из исследований проанализировали влияние физических и химических свойств шовного материала на прилипание *S. aureus* и *E. coli*. Было протестировано 10 видов шовного материала, включая кетгут, Дексон [Dexon], Викрил [Vicryl], Полидиоксанон [PolyDioxanone] и Пролон [Prolene]). Из рассасывающихся нитей наименьшим сродством к бактериальным клеткам обладал Полидиоксанон, наибольшим – Дексон. Зафиксированы [360] случаи кератита, связанного с шовным материалом, после сквозной кератопластики: нить позволила *Corynebacterium macginleyi* проникнуть в роговицу и сформировать биопленку.

К настоящему времени накопилось значительное количество данных о том, что микроорганизмы в составе БП влияют на течение хронических воспалительных заболеваний. Биопленки обладают высоким уровнем толерантности к антителам, фагоцитам, антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам. К сожалению, стандартные методы антибактериального лечения направлены на отдельно существующие планктонные клетки, тогда как бактерии внутри биоплёнки размножаются и вновь диссеминируют после завершения курса лечения, нередко формируя очаги хронической персистирующей инфекции, способствуя рецидивированию заболевания [361, 362, 363].

Сейчас не вызывает сомнений необходимость пересмотра концепции патогенеза различных бактериальных инфекций, используя имеющиеся данные о биопленках. В практическом отношении это требует внедрения новых методов диагностики и лечения.

## 10.1 Способность микроорганизмов формировать биоплёнки

### 10.1.1 Способность формировать биопленку возбудителей хирургической инфекции

С помощью разработанных методов культивирования и исследования микробных биоплёнок изучены свойства 192 клинических изолятов, выделенных от пациентов РНПЦ «Инфекция в хирургии», а также коллекционных штаммов *S.aureus* ATCC 6538, *P.aeruginosa* ATCC 9027, *E.coli* ATCC 8739 [364].

Среди изученных изолятов способность в той или иной степени формировать биоплёнку была обнаружена у 61,5% изолятов.

При изучении отдельных видов микроорганизмов обнаружено, что наиболее часто способность формировать биоплёнки встречалась у представителей *Acinetobacter spp.* (5 изолятов из 5 изученных – 100%), *Enterobacteriaceae* (5 изолятов из 5 изученных – 100%). Также часто БП формировали представители *S.aureus* (37 изолятов из 57 изученных – 65%), *P.aeruginosa* (65 изолятов из 107 изученных – 61%). Наименее часто формировали микробные сообщества представители *S.epidermidis* (5 изолятов из 12 изученных – 41,6%), *Streptococcus spp.* (1 изолят из 3 изученных – 33%). Результаты представлены на рисунке 10.1.

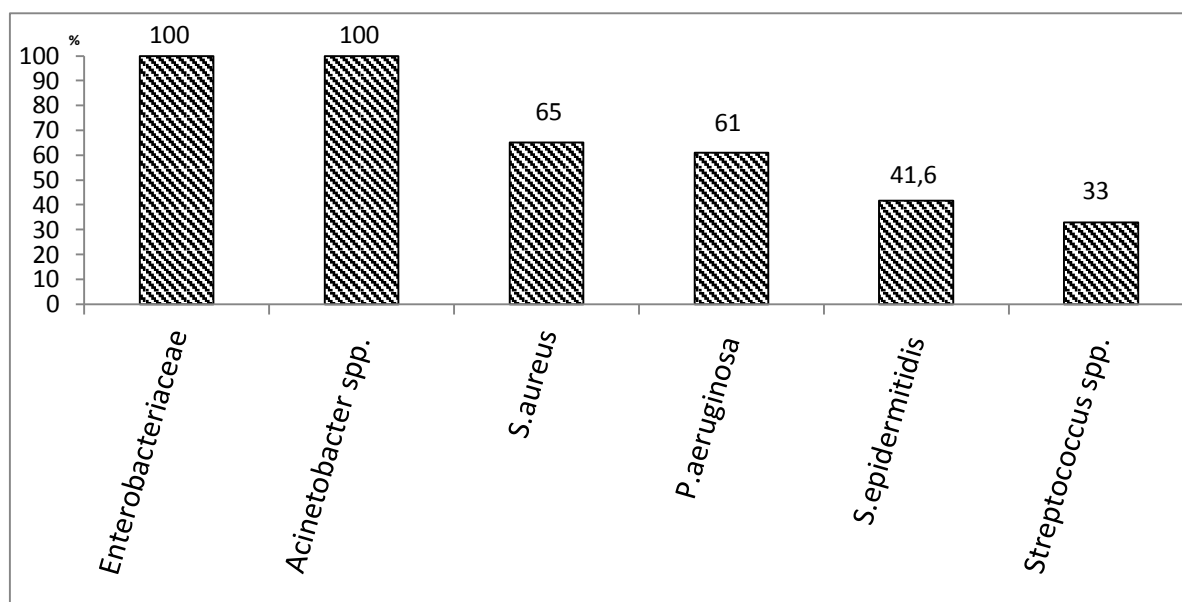


Рисунок 10.1 – Частота встречаемости способности микроорганизмов формировать биоплёнки

### 10.1.2 Способность формировать биоплёнку изолятами *P.aeruginosa*

Для изучения способности формировать микробные биопленки в полистироловом планшете с помощью спектрофотометрических методов, описанных выше, были изучены 57 изолятов *P.aeruginosa*, способных формировать микробные биоплёнки [301]. Результаты исследования представлены на рисунке 10.2.

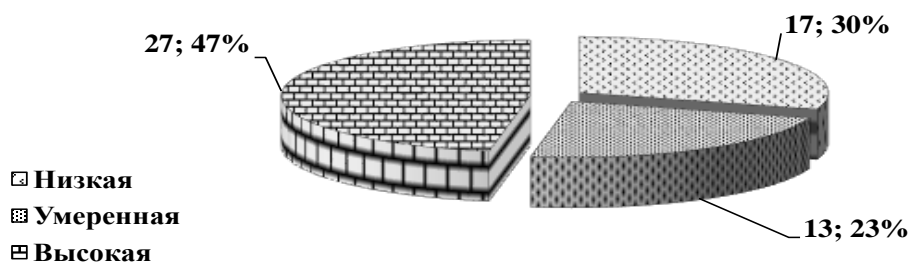


Рисунок 10.2 – Способность формировать биопленку изолятами *P.aeruginosa*

При проведении учёта спектрофотометрическим методом (окраска раствором кристаллического фиолетового) установлено, что 30% изолятов слабо формировали биоплётку (n=17), 23% изолятов формировали биоплётку в средней степени (n=13), 47% изолятов интенсивно формировали микробное сообщество (n=27).

#### 10.1.3 Способность формировать биопленку возбудителей одонтогенной инфекции

У 16 % изолятов *S.aureus*, выделенных от возбудителей одонтогенных абсцессов и флегмон, выявлена средняя способность образовывать БП, у 84% – сильная способность, что указывает на способность *S.aureus* в той или иной степени формировать БП. *S. epidermidis* продемонстрировали неспособность формировать БП в 34 %, среднюю способность – в 27%, сильную способность – в 39% случаев. Способность *S. pyogenes* формировать БП: 20% – слабая, 30% – средняя, 50% – сильная.

При этом у пациентов с острым одонтогенным гнойным периоститом была выявлена следующая способность возбудителей формировать биопленку: изоляты *S.aureus* в 100% случаев демонстрировали сильную способность формировать биопленку. У *S. epidermidis* в 45% случаев у изолятов определена слабая способность формировать биопленку, в 45% – средняя, в 10% – сильная, у *S. pyogenes* в 100% – слабая способность.

У пациентов с одонтогенными флегмонами одного клетчаточного пространства выявлена различная способность формировать БП. Так, *S. epidermidis* обладал слабой способностью образовывать БП в 17% случаев, средней – в 53%, сильной – в 30%. *S. pyogenes* имел слабую способность формировать БП в 25%, среднюю – в 37,5%, сильную – в 37,5%.

При развитии одонтогенной флегмоны двух клетчаточных пространств изоляты *S.aureus* обладали средней способностью формировать биопленку в 33%, сильной – в 66% случаев. Изоляты *S. epidermidis* в 17% случаев обладали слабой способностью формировать

БП, в 17% – средней, в 66% – сильной.

У пациентов с одонтогенными флегмонами дна полости рта все выделенные возбудители обладали сильной способностью формировать БП в 100% случаев.

У пациентов с тяжелыми гнойно-воспалительными процессами выявлены изоляты *S. epidermidis* и *S. pyogenes* с более сильной способностью формировать БП.

Таким образом, в ходе проведенного исследования выявлено, что возбудители одонтогенной инфекции в той или иной степени способны формировать микробные биопленки. Наибольшей способностью образовывать биопленку обладает *S. aureus*, наименьшей способностью – *S. epidermidis*. Выявлена положительная корреляция средней силы между способностью возбудителя формировать биопленку и распространенностью гнойно-воспалительного процесса челюстно-лицевой области [365].

#### 10.1.4 Толщина матрикса биопленки, сформированной на покровном стекле

Для исследования толщины биопленка была сформирована на покровных стёклах, как описано ранее. Определение толщины проводили с помощью световой и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Наиболее высокое значение толщины матрикса обнаружено в биоплёнках, сформированных изолятами *P. aeruginosa* ( $79 \pm 3,2$  мкм и  $81 \pm 3,6$ , соответственно, при измерении с помощью ЛСК микроскопии и световой микроскопии). Изоляты *S. aureus* и *E. coli* формировали биоплёнку меньшей толщины ( $56 \pm 2,3$  мкм и  $41 \pm 1,9$  мкм, соответственно при измерении с помощью ЛСК микроскопии, и  $58 \pm 3,1$  мкм и  $42 \pm 3,5$  мкм соответственно, при измерении с помощью световой микроскопии). Большое количество межклеточного матрикса и, соответственно, значительная толщина биопленки может существенно препятствовать проникновению антисептиков и антибиотиков к бактериям в составе биопленки, что приведет к снижению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Результаты определения толщины матрикса биопленки представлены на рисунке 10.3.

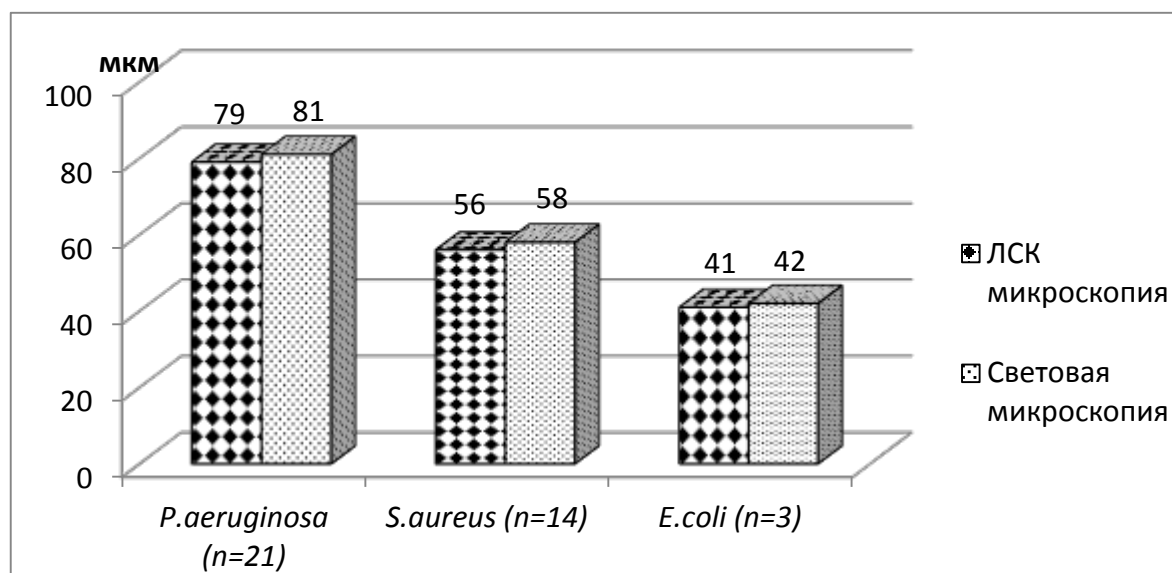


Рисунок 10.3 – Толщина матрикса микробных биопленок

При изучении результатов измерения толщины микробных биопленок обнаружено, что данные ЛСК микроскопии и разработанного метода определения толщины с помощью световой микроскопии не имеют статистически значимых различий ( $p < 0,05$ ).

Установлено, что большинство возбудителей хирургической и одонтогенной инфекции способны формировать биоплёнки. В ходе исследований произведена количественная оценка способности возбудителей инфекции формировать БП в 96-луночном полистироловом планшете, что представлено в таблице 10.1.

Таблица 10.1 – Качественные и количественные характеристики способности возбудителей инфекции формировать биопленку

Микроорганизм	n	Масса БП Me (LQ;UQ), мкг/лунку	min	max	% бактерий, не образующих БП
Изоляты, выделенные от пациентов с хирургической инфекцией					
<i>E. coli</i>	8	3,31 (0,48;11,39)	0,26	22,2	0
<i>P.aeruginosa</i>	16	11,55 (2,58;24,14)	0,98	98,5	0
<i>S.aureus</i>	41	3,38 (1,94;5,99)	0,4	65,6	0
<i>S. epidermidis</i>	7	3,61 (0,67;8,71)	0,26	10,64	0
<i>Acinetobacter spp.</i>	7	4,8 (2,47;27,98)	1,4	48,9	0
Изоляты одонтогенного происхождения (периодонтальная микрофлора)					
<i>S. oralis</i>	26	9,6 (6,11;12,3)	1,34	35,1	19
<i>S. mutans</i>	3	10,8 (9,5;16,8)	9,5	22,9	0
<i>S. sanguis</i>	11	8,7 (4,9;16,1)	3,3	27,9	36,4
<i>S. mitis</i>	10	6,9 (5,5;10,2)	2,9	15,5	10
<i>S. anginosus</i>	7	8,7 (5,2;11,9)	4,8	20,5	28,6
<i>G. morbillorum</i>	7	6,3 (3,71;4,2)	2,3	38	14,3

Микроорганизм	n	Масса БП Me (LQ;UQ), мкг/лунку	min	max	% бактерий, не образующих БП
Изоляты одонтогенного происхождения (периодонтальная микрофлора)					
<i>L. lactis</i>	6	5,4 (4,9;5,8)	4,8	20,5	33,3
<i>S. epidermidis</i>	13	10,3 (8,1;11,3)	5,3	11,8	23
Изоляты одонтогенного происхождения (абсцессы, флегмоны)					
<i>S.aureus</i>	17	13,5 (6,2; 18,4)	0,63	55	0
<i>S. epidermidis</i>	55	9,02 (3,72; 13,5)	0,63	178,4	36

Согласно полученным результатам синегнойная палочка обладает наибольшей продуцирующей способностью БП. Данный микроорганизм достоверно ( $p<0,05$ ) более высокий продуцент, чем золотистый и эпидермальный стафилококк. Среди изолятов одонтогенного происхождения лучше всего образуют БП *S. mutans* и эпидермальный стафилококк [350].

## 10.2 Клинические показатели пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности возбудителя формировать биопленку

Выполнена оценка возможности применения клинического принципа для лечения пациентов с гнойными ранами с учётом способности возбудителей формировать биопленку [366, 367].

В ходе проведенного исследования изучена динамика раневого процесса и клинических показателей пациентов с гнойными ранами, стандартное лечение. В зависимости от способности возбудителей формировать БП выделены две подгруппы: в подгруппе 1 (34 человека), выделенные возбудители хирургической инфекции не обладали способностью формировать БП, в подгруппе 2 (31 человек), выделенные возбудители обладали способностью формировать БП. Длительность лихорадки у пациентов первой и второй подгрупп с гнойными ранами составила 0 (0;3) суток и 3 (2;8) суток, соответственно,  $p=0,0007$ . Средняя длительность госпитализации в исследуемых подгруппах также статистически значимо отличалась в зависимости от способности возбудителя образовывать биопленку. В первой подгруппе средний койко-день составил 11 (8; 18) суток, во второй – 21 (11; 38) сутки,  $p=0,001$ .

Очищение гнойной раны у пациентов первой подгруппы происходило в среднем на 5,5 (4; 7) сутки, тогда как у пациентов второй подгруппы очищение раны происходило на 9,5 (4; 16) сутки, различия статистически достоверны при  $p=0,02$ . У пациентов первой подгруппы появление грануляций в ране наблюдалось на 4,5 (4; 7) сутки, тогда как во второй подгруппе признаки грануляции появлялись лишь на 6,5 (4; 14) сутки,  $p=0,03$ . Начало краевой эпителизации при выявлении способности возбудителя к формированию биопленки также наступало позже, чем в



случае отсутствия у возбудителя способности образовывать биопленку, соответственно, во второй подгруппе эпителизация появлялась на 9 (4; 16) сутки, в первой – на 7 (5; 8) сутки,  $p=0,02$ . Результаты представлены на рисунке 10. 4.

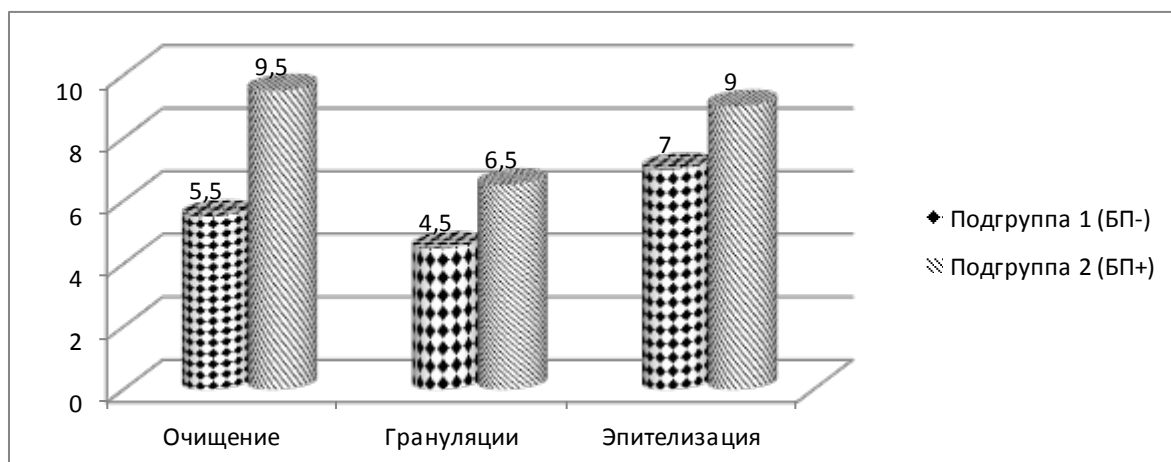


Рисунок 10.4 – Динамика раневого процесса

Самочувствие пациентов первой и второй подгрупп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалось: 3 (3; 3) балла в первой подгруппе и 3 (3; 4) балла во второй ( $p>0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые сутки госпитализации – 4 (4; 4) в первой подгруппе и 4 (4; 3) балла во второй ( $p>0,05$ ). Однако на 10-е сутки лечения самочувствие пациентов первой подгруппы статистически значимо было лучше, чем у пациентов второй подгруппы, 4 (4; 5) балла и 4 (3; 4) балла соответственно,  $p=0,007$ . Результаты представлены на рисунке 10.5.

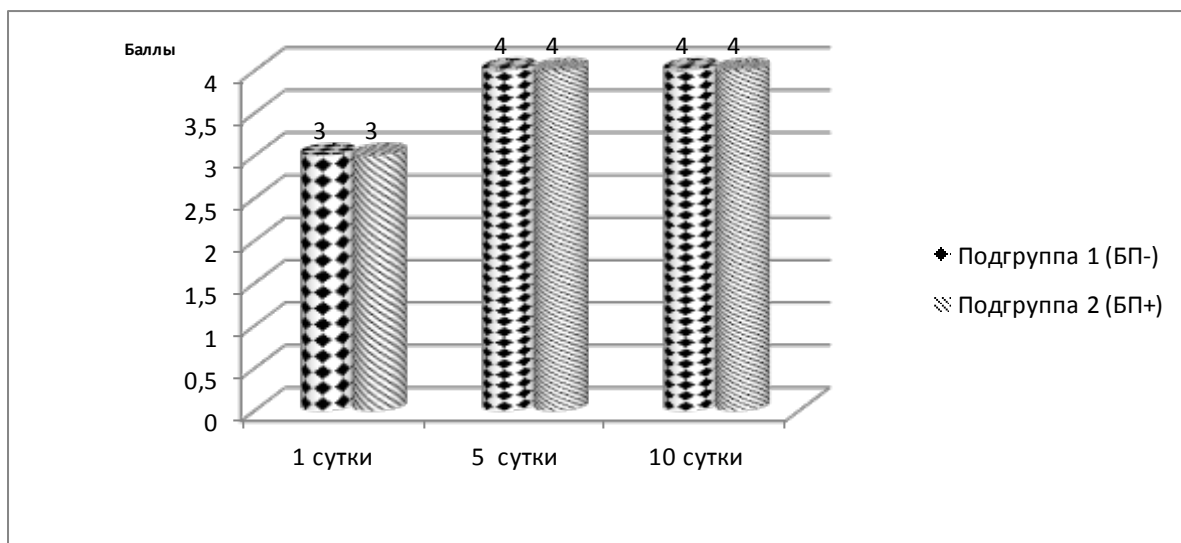


Рисунок 10.5 – Самочувствие пациентов

Выраженность болевого синдрома у пациентов первой и второй подгрупп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалась: 8 (8; 8) баллов в первой подгруппе и 8 (7; 8) баллов во второй ( $p>0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые сутки госпитализации: 6 (6; 7) баллов в первой подгруппе и 7 (5; 8) баллов - во второй ( $p>0,05$ ). Однако на 10-е сутки лечения выраженность болевого синдрома у пациентов первой подгруппы контрольной группы была статистически значимо ниже, чем у пациентов второй подгруппы, 5 (4; 5) баллов и 6 (5; 7) баллов соответственно,  $p=0,002$ . Результаты представлены на рисунке 10.6.

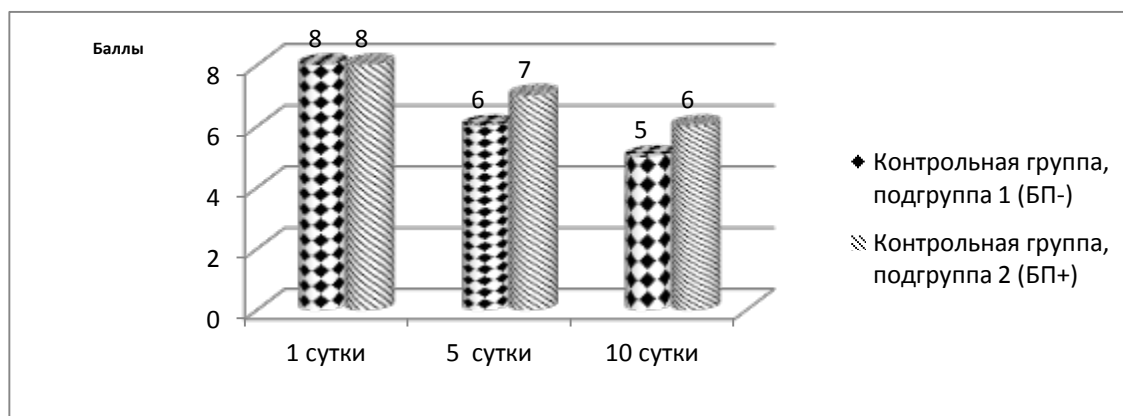


Рисунок 10.6 – Выраженность болевого синдрома

Выраженность отёка у пациентов первой и второй подгрупп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалась: 8 (7; 8) баллов в первой подгруппе и 8 (7; 8) баллов во второй ( $p>0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые сутки госпитализации: 6 (5; 7) баллов в первой подгруппе и 6 (5; 7) баллов во второй ( $p>0,05$ ). Однако на 10-е сутки лечения выраженность отёка у пациентов первой подгруппы была статистически значимо ниже, чем у пациентов второй подгруппы, 4 (3; 5) балла и 5 (4; 7) баллов соответственно,  $p=0,03$ . Результаты представлены на рисунке 10.7.

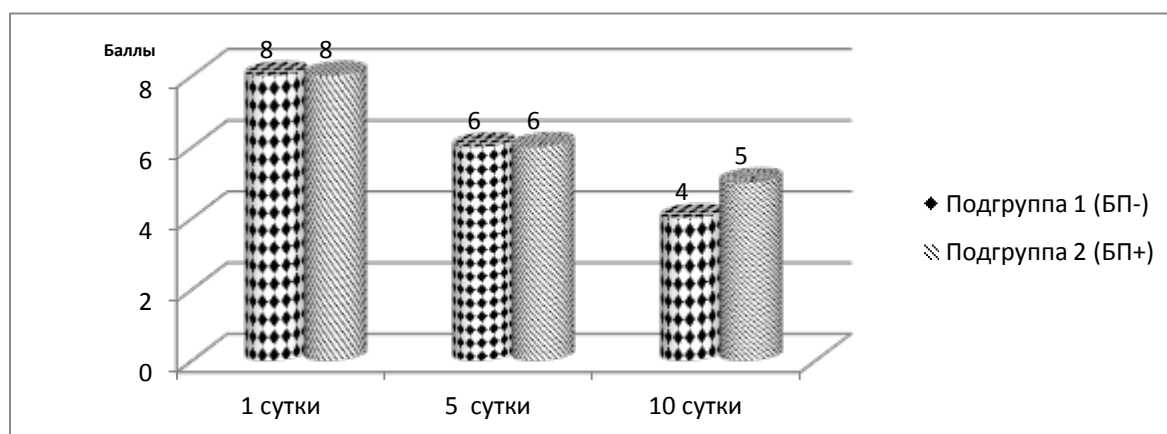


Рисунок 10.7 – Выраженность отёка

Выраженность гиперемии мягких тканей у пациентов первой и второй подгрупп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалась: 8 (7; 8) баллов в первой подгруппе и 8 (7; 8) баллов во второй ( $p>0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые сутки госпитализации: 6 (4; 6) баллов в первой подгруппе и 6 (5; 7) баллов во второй ( $p>0,05$ ). При этом на 10-е сутки лечения выраженность гиперемии у пациентов первой подгруппы была значительно ниже, чем у пациентов второй подгруппы: 4 (3; 5) балла и 5 (4; 6) баллов, соответственно,  $p<0,05$ . Результаты представлены на рисунке 10.8.

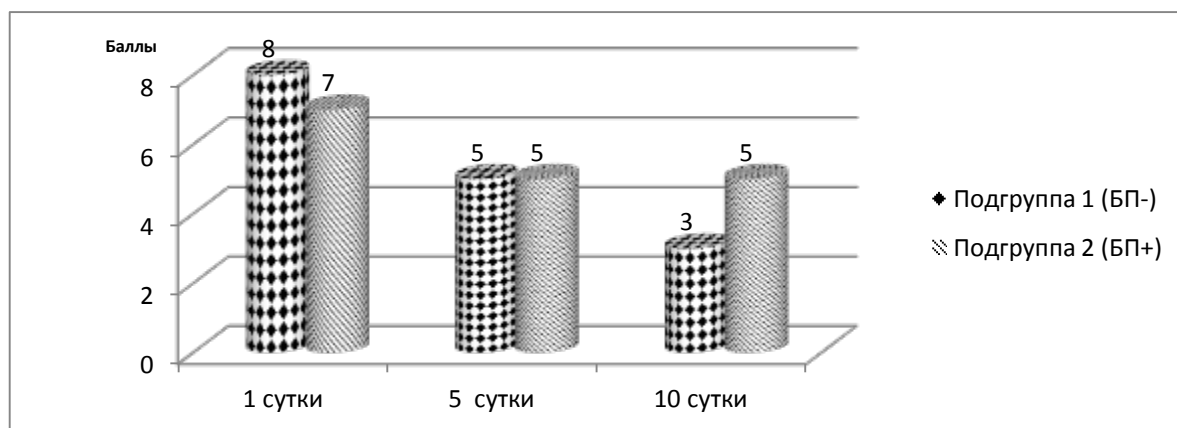


Рисунок 10.8 – Выраженность гиперемии

Количество раневого отделяемого у пациентов первой и второй подгрупп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалось: 8 (7; 8) баллов в первой подгруппе и 7 (6; 8) баллов во второй ( $p>0,05$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на пятые сутки госпитализации: 5 (4; 7) баллов в первой подгруппе и 5 (4; 7) баллов во второй ( $p>0,05$ ). Однако на 10-е сутки лечения количество раневого отделяемого у пациентов первой подгруппы статистически значимо было меньше, чем у пациентов второй подгруппы: 3 (2,5; 4,5) балла и 5 (3; 7) баллов соответственно,  $p=0,04$ . Результаты представлены на рисунке 10.9.

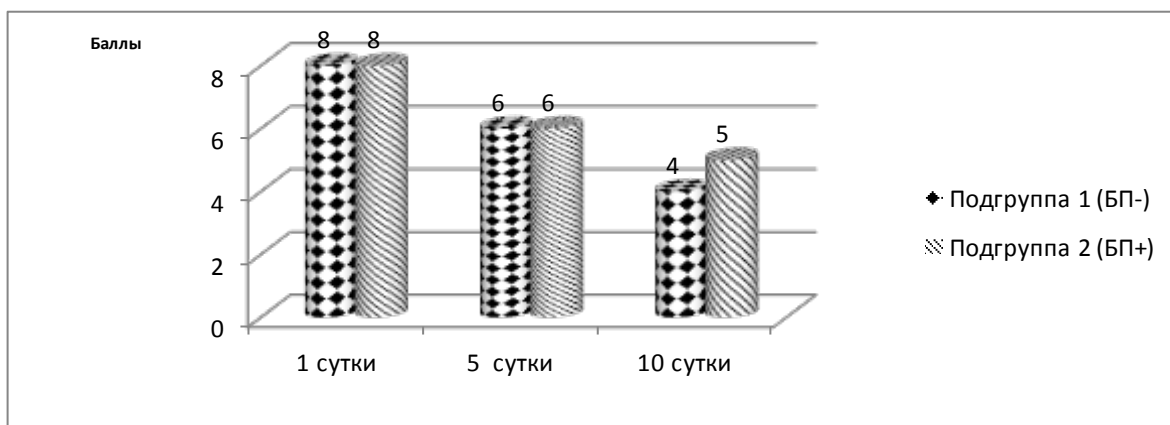


Рисунок 10.9 – Количество раневого отделяемого

Полученные результаты указывают на отсутствие отличий в клинической картине до лечения и в первые сутки лечения, что не позволяет назначить лечение с учётом способности возбудителей образовывать биоплёнку, основываясь только на клинических показателях. Однако наличие статистически значимых отличий на 10-е сутки указывает на недостаточную эффективность лечения пациентов с хирургической инфекцией мягких тканей, возбудители которой способны формировать биоплёнки.

Таким образом, полученные данные показывают, что клинические характеристики раны, а также длительность лихорадки и длительность пребывания в стационаре пациентов с гнойными ранами зависят от способности выделенного возбудителя образовывать микробное сообщество – биопленку. В случае если возбудитель обладает способностью формировать биоплёнку, сроки очищения раны, появления грануляций и начала краевой эпителизации значительно увеличиваются. Период лихорадки и длительность госпитализации существенно больше у пациентов, выделенный возбудитель которых способен образовывать биопленку.

Использование клинического принципа для лечения гнойных ран в зависимости от способности возбудителей формировать биопленки имеет ограничения, так как полученные результаты указывают на отсутствие влияния способности формировать биоплёнку на видимые различия между раневыми дефектами до лечения и в первые сутки лечения, что не позволяет назначить лечение с учётом способности возбудителей образовывать биоплёнку, основываясь только на клинических показателях [368].

### **10.3 Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами с учетом способности возбудителей формировать биопленку**

Согласно фармакологическому принципу эффективная антибиотикотерапия возможна при достижении препаратом концентрации, превышающей МПК, в инфицированных тканях. Однако данные литературы [369] и результаты наших исследований показывают, что биопленка является действенным механизмом защиты от большинства антибактериальных препаратов. Поэтому, несмотря на то, что по критериям назначения антибиотикотерапии [370] 87,5% обследованных пациентов нуждались в системной химиотерапии, её эффективность сомнительна в отношении бактерий в составе биопленки, т.к. 100% изученных изолятов *P.aeruginosa* в составе биопленки оказались резистентны ко всем изученным АБ, а чувствительность *S.aureus* в составе биоплёнки к изученным АБ была значительно (в два и более раз) ниже по сравнению с планктонными формами.

Исходя из вышеперечисленных принципов разработки химиотерапии, результатов исследования способности антисептиков

разрушать биоплёнку, результатов определения МПК для бактерий в составе биоплёнки, определения частоты встречаемости отдельных видов и групп микроорганизмов, их чувствительности к антибактериальным препаратам предложено в случае, если возбудитель хирургической инфекции способен формировать биоплёнку, то в составе комплексного лечения использовать антибиотики согласно результатам микробиологического исследования. А для местного лечения гнойных ран использовать вакуум-промывной дренаж с применением 30% раствора димексида, разрушающего микробную БП, в качестве промывной жидкости [116].

Наложение повязки для вакуум-промывного дренажа состоит из нескольких этапов:

1. В операционной под внутривенным наркозом обрабатывают операционное поле.
  2. Выполняют хирургическую обработку гнойного очага.
  3. На дно раны укладывают трубку для орошения.
  4. Налаживают систему для вакуумной терапии ран:
    - а) укрывают рану пористым материалом с трубкой;
    - б) обрабатывают кожу вокруг раны 70% этиловым спиртом для обезжиривания;
    - в) герметично закрывают раневой дефект покрытием хирургическим антимикробным разрезаемым;
    - г) подсоединяют неспадающую дренажную трубку к источнику вакуума, на котором выставляют уровень отрицательного давления - 125 мм рт.ст.
  5. Через трубку для орошения налаживали промывание раны 30% раствором димексида со скоростью 30 капель в минуту.
  6. Контрольные смены повязок производились через 2-5 дней до появления полного очищения раны и появления грануляций.
- Предложенный комплексный метод лечения пациентов с гнойными ранами мягких тканей с учётом способности возбудителей формировать микробные сообщества внедрён в практическое здравоохранение.

#### **10.4 Клинические показатели пациентов с гнойными ранами при использовании комплексного метода лечения с учетом способности микроорганизмов формировать биопленку**

В ходе сравнения клинических показателей пациентов, от которых выделены возбудители способные формировать биоплёнку, при проведении стандартного комплексного лечения (контрольная группа) и предложенного комплексного лечения (основная группа) получены статистически значимые отличия. Длительность лихорадки у пациентов контрольной группы и основной группы составила 3 (2;8) суток и 2 (0;3) суток, соответственно,  $p=0,02$ . Средняя длительность лечения в исследуемых группах также статистически значимо отличалась: в

контрольной группе лечение длилось 21 (11; 38) суток, а в основной – 15 (12; 20) суток,  $p=0,03$ .

Очищение гнойной раны у пациентов контрольной группы происходило на 9,5 (4; 16) сутки, тогда как у пациентов основной группы на 4 (4; 4) сутки, различия статистически достоверны при  $p=0,005$ . У пациентов контрольной группы появление грануляций в ране наблюдалось на 6,5 (4; 14) сутки, тогда как в основной группе признаки грануляции появлялись на 4 (4;5) сутки,  $p=0,04$ . Начало краевой эпителизации при использовании стандартного лечения также наступало позже, чем в случае использования лечения с учётом способности возбудителей формировать биоплёнку, соответственно, в основной группе краевая эпителизация появлялась на 5 (4; 6) сутки, в контрольной – на 9 (4; 16) сутки,  $p=0,004$ . Результаты представлены на рисунке 10.10.

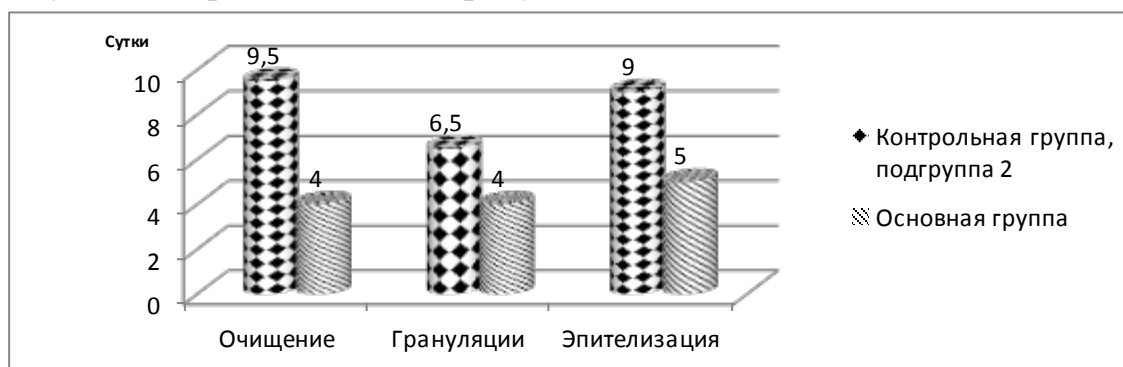


Рисунок 10.10 – Динамика раневого процесса

Самочувствие пациентов контрольной и основной групп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалось: 3 (3; 4) балла в контрольной группе и 3 (3; 3) балла в основной ( $p>0,05$ ). Однако уже на пятые сутки лечения самочувствие пациентов основной группы было статистически значимо лучше – 4 (3; 4) балла в контрольной и 4 (4; 4) балла в основной ( $p=0,02$ ). На 10-е сутки лечения самочувствие пациентов основной группы так же статистически значимо было лучше, чем у пациентов контрольной группы: 4 (3; 4) балла и 5 (4; 5) баллов соответственно,  $p=0,001$ . Результаты представлены на рисунке 10.11.

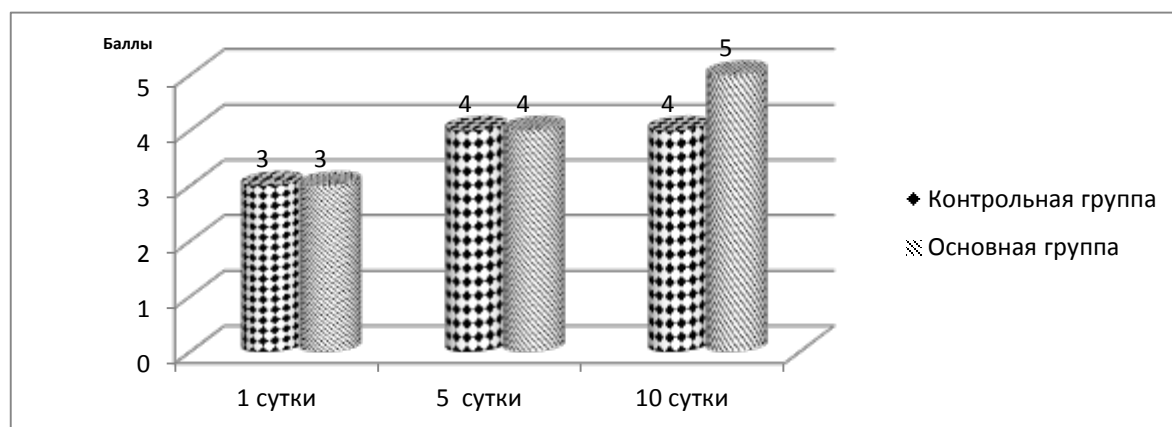


Рисунок 10.11 – Самочувствие пациентов

Выраженность болевого синдрома у пациентов контрольной и основной групп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалась: 8 (7; 8) баллов в контрольной группе и 8 (8; 9) баллов во второй ( $p>0,05$ ). Однако уже на пятые сутки лечения пациенты основной группы отмечали снижение выраженности болевого синдрома: 7 (5; 8) баллов в контрольной группе и 6 (6; 6) баллов в основной ( $p=0,03$ ). На 10-е сутки лечения выраженность болевого синдрома у пациентов контрольной группы статистически значимо была выше, чем у пациентов основной группы: 6 (5; 7) баллов и 4 (4; 4) балла соответственно,  $p<0,001$ . Результаты представлены на рисунке 10.12.

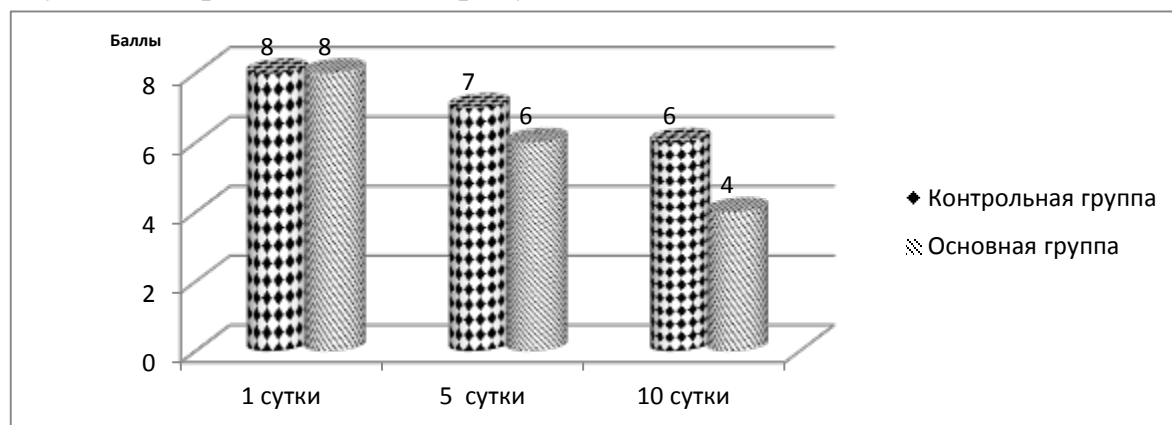


Рисунок 10.12 – Выраженность болевого синдрома

Выраженность отёка у пациентов контрольной и основной групп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалась: 8 (7; 8) баллов в контрольной группе и 8 (7; 9) баллов в основной ( $p>0,05$ ). На пятые сутки лечения выраженность отёка мягких тканей у пациентов основной группы была статистически значимо ниже, чем у пациентов контрольной группы: 5 (5; 5) баллов и 6 (5; 7) баллов соответственно ( $p=0,004$ ). На 10-е сутки лечения выраженность отёка у пациентов основной группы так же была статистически значимо ниже, чем у пациентов контрольной группы: 4 (3; 4) балла и 5 (4; 7) баллов соответственно,  $p=0,006$ . Результаты представлены на рисунке 10.13.

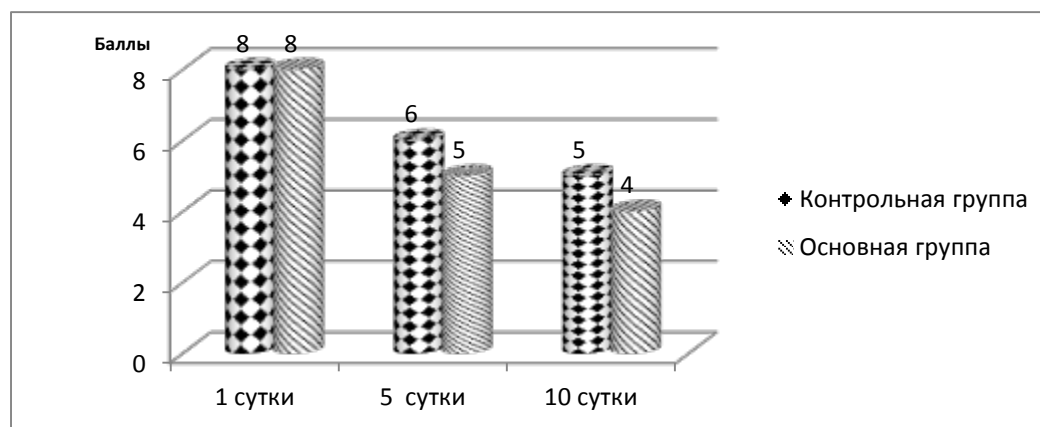


Рисунок 10.13 – Выраженность отёка

Гиперемия мягких тканей у пациентов контрольной и основной групп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалась: 8 (7; 8) баллов в контрольной группе и 8 (8; 8) баллов в основной ( $p>0,05$ ). Однако на пятые сутки лечения выраженность гиперемии у пациентов основной группы была статистически значимо ниже: 5 (5; 5) баллов в основной группе и 6 (5; 7) баллов в контрольной ( $p=0,002$ ). Такая же ситуация наблюдалась и на 10-е сутки лечения: выраженность гиперемии у пациентов основной группы была значительно ниже, чем у пациентов контрольной группы: 3 (3; 4) балла и 5 (4; 6) баллов соответственно ( $p=0,001$ ). Результаты представлены на рисунке 10.14.

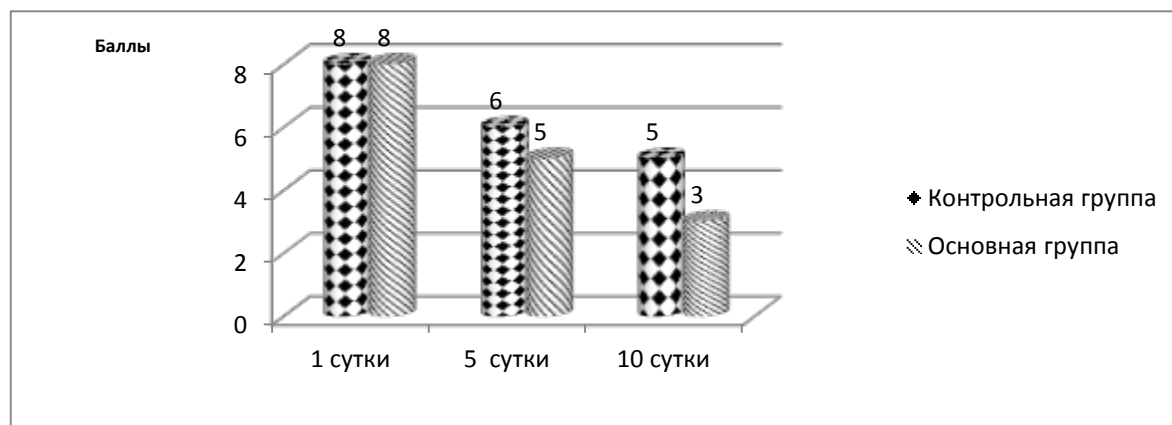


Рисунок 10.14 – Выраженность гиперемии

Количество раневого отделяемого у пациентов контрольной и основной групп в течение первых суток лечения статистически значимо не отличалось: 8 (7; 9) баллов в основной группе и 7 (6; 8) баллов в контрольной ( $p>0,05$ ). Однако на пятые сутки госпитализации наблюдались различия в количестве раневого отделяемого: 4 (4; 5) баллов в основной группе и 5 (4; 7) баллов в контрольной ( $p=0,01$ ). Та же ситуация наблюдалась и на 10-е сутки лечения, количество раневого отделяемого у пациентов основной группы статистически значимо было меньше, чем у пациентов контрольной группы: 3 (3; 4) балла и 5 (3; 7) баллов соответственно,  $p=0,008$ . Результаты представлены на рисунке 10.15.

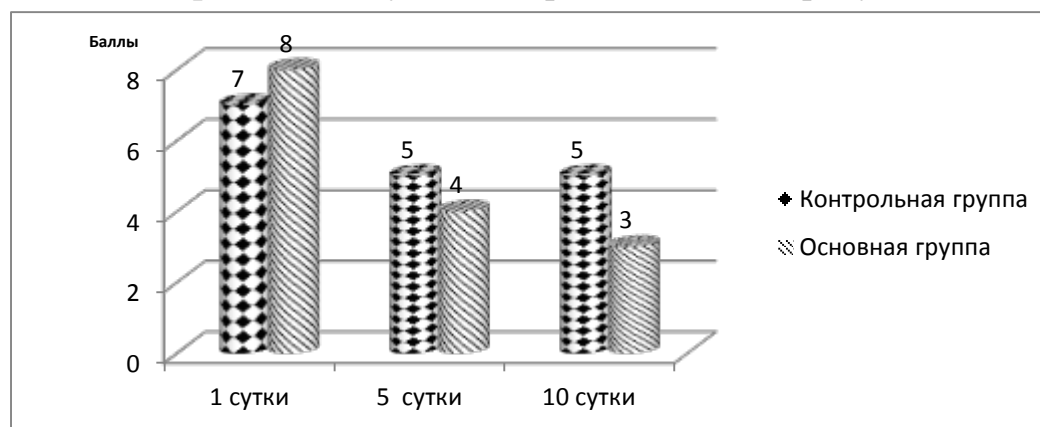


Рисунок 10.15 – Количество раневого отделяемого



В ходе изучения бактериальной обсеменённости раны до и после использования вакуумной повязки выявлено, что до её использования наблюдалась высокая микробная контаминация раны – от  $10^6$  до  $10^8$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Однако после использования вакуумной повязки контаминация раны значительно снижалась – от отсутствия роста до  $10^3$  КОЕ/см<sup>3</sup>. Снижение контаминации раны благоприятно повлияло на дальнейшее закрытие раневого дефекта аутокожей или местными тканями на 5,5 (4; 6) сутки.

Таким образом, проведенные исследования показали, что сроки очищения раны, появления грануляций и начало краевой эпителизации значительно увеличиваются в случае, если возбудитель хирургической инфекции способен формировать биоплёнку. Период лихорадки и длительность госпитализации существенно больше у пациентов, от которых выделен возбудитель, способный образовывать биопленку.

При этом разработанное комплексное лечение пациентов с гнойной инфекцией мягких тканей с учётом способности возбудителей формировать биоплёнку позволяет эффективно воздействовать на возбудителя в составе биопленки и успешно купировать гнойно-воспалительный процесс мягких тканей. Использование разработанного комплексного лечения гнойных ран позволило сократить сроки лечения пациентов данной категории на 6 суток ( $p=0,03$ ), что подтверждает экономическую эффективность лечения [368].

## **11. АНТИБИОТИКОТЕРАПИЯ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ С УЧЕТОМ СПОСОБНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКУ**

### **11.1 Алгоритм антибактериальной терапии инфекционно-воспалительных заболеваний с учетом способности возбудителя формировать биопленку**

В случае необходимости назначения пациенту системной АБТ при подозрении на инфекцию, вызванную способным формировать БП микроорганизмом, решение принимается по следующему алгоритму.

1. До назначения АБТ выполнить забор материала, включая удаленное инородное тело (катетеры и т.п.), для идентификации возбудителя, определения его чувствительности к АБТ и способности формировать БП.

2. До получения результатов бактериологического исследования необходимо определить возможное образование БП в очаге инфекции по косвенным клиническим признакам и назначить АБТ, эффективную против БП, в случае:

- наличия инородных тел (протезы, катетеры, клапаны, дренажи, имплантаты и др.) – повышают риск образования БП;
- обострения хронической инфекции, непосредственно связанной с очагом инфекции (хронический остеомиелит, синусит, периодонтит) – увеличивается риск образования БП за счет более длительного течения процесса;
- изменение цвета перевязочного материала (например, зелёный цвет повязки указывает на наличие *P.aeruginosa*, которая с высокой вероятностью формирует БП);
- наличие запаха из раны, например, тухлых яиц (сероводорода) – указывает на наличие протей, который с высокой вероятностью формирует БП;
- наличие признаков анаэробной инфекции (газообразование, характерный каловый запах, и др.) – анаэробы с вероятностью более 90% формируют БП);

3. Решение об изменении стартовой АБТ возможно принять по результатам экспресс-исследований на образование БП возбудителем:

- электронной микроскопии (слой микробных клеток, прикрепленных к поверхности и скрепленных между собой внеклеточным матриксом);
- данных ПЦР на наличие генов, ответственных за формирование биоплёнки.

4. По результатам исследования способности формировать БП *in vitro*:

4.1. В случае, если был назначен АБ, не эффективный в отношении возбудителя в составе БП, и лабораторные методы не подтверждают способность возбудителя формировать БП, продолжать стартовую АБТ.

4.2. В случае, если был назначен АБ, не эффективный в отношении БП, не наблюдается клинического эффекта, а лабораторные методы

подтверждают способность возбудителя формировать БП, изменить АБ на эффективный в отношении возбудителя в составе БП.

4.3. В случае, если был назначен АБ, не эффективный в отношении возбудителя в составе БП, однако наблюдается клинический эффект в течение 48 часов, а лабораторные методы подтверждают способность возбудителя формировать БП, АБ не менять, т.к., вероятно, в очаге инфекции не возникает условий для формирования БП.

## **11.2 Идентификация и определение чувствительности к антибактериальным препаратам возбудителей основных возбудителей гнойно-воспалительных осложнений синдрома диабетической стопы**

Высокая частота осложнений сахарного диабета, вызывающих инвалидность и летальность пациентов, определяет медицинскую и социальную актуальность этой патологии для медицины и общества. Из осложнений диабета, наиболее часто приводящим к инвалидности и снижению качества жизни пациентов, является синдром «диабетической стопы». В целом, многие вопросы микробиологии гнойно-некротического очага нижних конечностей на фоне сахарного диабета остаются открытыми. До конца не определена роль аэробной и неклостридиальной анаэробной микрофлоры в возникновении и развитии гнойно-воспалительных осложнений при синдроме диабетической стопы, не решены вопросы рациональных путей введения антибактериальных препаратов к патологическому очагу и режимов их дозирования. Спорными остаются вопросы о необходимости комбинированной антибиотикотерапии, возможности назначения препаратов эмпирическим путем и др.

По нашему мнению, назначение препаратов эмпирическим путем следует рассматривать как вполне обоснованное, так как в тяжелых случаях невозможно достаточно быстро (в течение нескольких часов) идентифицировать возбудителя и определить спектр чувствительности его к антибактериальным препаратам. Поэтому целесообразно создавать схемы эмпирической антибиотикотерапии с учетом различий в спектре возбудителей, способности микроорганизма формировать БП и колебаний в проявлении резистентности в каждом отдельном хирургическом стационаре.

От 170 пациентов с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей при синдроме «диабетической стопы» на фоне сахарного диабета 1 и 2 типов в УЗ «Витебская областная клиническая больница» выделено 323 изолята микроорганизмов, из которых 143 (44,2%) изолята представители рода *Staphylococcus*, 110 изолятов (34%) семейства *Enterobacteriaceae*, 51 изолят (15,8%) семейства *Pseudomonadaceae*, 9 изолятов (2,8%) представителей семейства *Streptococcaceae*, 7 изолятов НГОП (2,2%) и по одному изоляту *B.subtilis*, *B. cereus* и *Vibrio alginolyticus* (0,3%). Отрицательные результаты первичных посевов получены при

исследовании микрофлоры в 13 случаях. Спектр микробной флоры у пациентов с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей в зависимости от типа сахарного диабета и ее способность формировать БП представлен в таблице 11.1.

Таблица 11.1 – Спектр микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей на фоне сахарного диабета 1-го и 2-го типа

Изолят микроорганизмов	Сахарный диабет 1-го типа		Сахарный диабет 2-го типа		Вероятность формирования БП
<i>Staphylococcus spp.</i>	74	44,31%	69	44,23%	60-80%
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	54	32,33%	56	35,89%	70-100%
<i>Pseudomonadaceae spp.</i>	27	16,16%	24	15,38%	60-80%
<i>Streptococcus spp.</i>	5	2,99%	4	2,56%	33-71%
НГОП	5	2,99%	2	1,28%	70-90%
<i>Bacillus spp.</i>	1	0,59%	1	0,64%	37-67%
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	0,59%	0	0%	72-90%
Всего 323	167	-	156	-	-

Спектр микробной флоры у пациентов с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей в зависимости от типа сахарного диабета и ее способность формировать БП представлен в таблице 11.2.

Таблица 11.2 – Спектр микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с гнойно-некротическими поражениями нижних конечностей на фоне сахарного диабета 1-го и 2-го типа

Изолят микроорганизмов	Сахарный диабет 1-го типа		Сахарный диабет 2-го типа		Вероятность формирования БП
<i>P. mirabilis</i>	23	26,74%	11	13,4%	70-100%
<i>P. vulgaris</i>	10	11,6%	10	12,19%	70-100%
<i>E. coli</i>	6	6,97%	12	14,6%	70-100%
<i>E. cloacae</i>	3	3,48%	9	10,97%	70-100%
<i>K.pneumoniae</i>	2	2,3%	7	8,5%	70-100%
<i>M.morganii</i>	4	4,6%	1	1,2%	70-100%
<i>K. oxytoca</i>	1	1,16%	3	3,65%	70-100%
<i>S. marcescens</i>	2	2,3%	1	1,2%	70-100%
<i>C. freundii</i>	2	2,3%	1	1,2%	70-100%
<i>S.proteamaculans</i>	1	1,16%	0	0%	70-100%
<i>E.aerogenes</i>	0	0%	1	1,2%	70-100%
<i>P.aeruginosa</i>	27	31,3%	23	28%	60-80%
<i>P. putida</i>	0	0%	1	1,2%	60-80%
<i>A.baumannii</i>	3	3,4%	2	2,4%	100%
<i>A. sobria</i>	2	2,3%	0	0%	70-90%

При помощи тест-систем среди всех выделенных микроорганизмов энтеробактерии были идентифицированы как *P. mirabilis* – 34 изолята (10,52%), *P. vulgaris* – 20 (6,1%), *E. coli* – 18 (5,5%), *E. cloacae* – 12 (3,7%), *K. pneumoniae* – 9 (2,8%), *M. morganii* – 5 (1,5%), *K. oxytoca* – 4 (1,2%), *S.*

*marcescens* и *C. freundii* – по 3 изолята (0,9%). *Serratia proteamaculans*, *E.aerogenes* – выделялись по 1 изоляту (0,3%). Из представителей семейства *Pseudomonadaceae* выделены *P. aeruginosa* – 50 изолятов (15,4%) и *P. putida* – 1 (0,3%). Из НГОП выделены *A. baumannii* – 5 изолятов (1,5%), *A.sobria* – 2 (0,6%).

Учитывая отсутствие достоверных различий, за исключением частоты высеваемости *P. mirabilis*, в этиологической структуре возбудителей гнойно-некротических поражений нижних конечностей, пациенты с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа были объединены в одну группу.

В 40,8% случаев (132 изолята) выделялся только один вид бактерий, а в большинстве случаев 59,1% (191 изолят) микробные ассоциации (табл. 11.3).

Таблица 11.3 – Ассоциации микробной флоры, способной формировать биопленку, при синдроме «диабетической стопы»

Ассоциация	Количество	Вероятность формирования БП
<i>Enterobacteriaceae spp. + S.aureus</i>	26	90-100%
<i>Enterobacteriaceae spp.+ KOC</i>	21	90-100%
<i>P.aeruginosa + S.aureus</i>	10	90-100%
<i>P.aeruginosa + KOC</i>	8	70-90%
НГОП + <i>Staphylococcus spp.</i>	4	70-90%
<i>P.aeruginosa + Proteus spp.</i>	4	90-100%
<i>Staphylococcus spp.+ Streptococcus spp.</i>	3	50-80%
<i>P.aeruginosa + S.aureus + Proteus spp.</i>	3	90-100%
<i>Enterococcus spp. или Streptococcus spp.+ Staphylococcus spp.</i>	3	50-80%
<i>P.mirabilis + S. marcescens</i>	1	90-100%
<i>E.coli + S.aureus + S.pyogenes</i>	1	90-100%
<i>P.vulgaris + S.aureus + S.hominis</i>	1	90-100%
<i>P.vulgaris + P.aeruginosa + S.epidermidis</i>	1	90-100%
<i>E.coli + S.aureus + P.vulgaris</i>	1	90-100%
<i>E.coli + S.simulans + P.aeruginosa</i>	1	90-100%
<i>Aeromonas sobria + S.lentus</i>	1	90-100%
<i>E.cloacae + P.aeruginosa</i>	1	70-90%
Всего	90	

Наиболее распространенным у данной категории пациентов, судя по результатам посевов, было сочетание *S.aureus* или КОС с представителем семейства энтеробактерий (48,9%).

Согласно полученным данным, инфекция при синдроме диабетической стопы характеризовалась значительным многообразием экзогенных возбудителей, из которых с высокой частотой встречались представители энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов (52,02%), которые могут выступать в качестве основных возбудителей [371].

Одно из ведущих мест в комплексном лечении гнойно-некротических заболеваний стоп и гангрены нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом занимает выбор антибиотиков в комплексном лечении гнойно-некротических поражений.

Энтеробактерии проявили наибольшую чувствительность к ципрофлоксацину и имипенему – 85%, офлоксацину – 84%, азтреонаму – 82%, амикацину – 81%, цефтазидиму и нетилмицину – 75%.

Изоляты очень многих видов энтеробактерии в 81% случаев оказались резистентны к амоксициллину, а к комбинации амоксициллина с клавулановой кислотой в – 67% случаев. Внутри семейства энтеробактерий наблюдаются различия в спектре чувствительности к антибиотикам различных родов и видов. Представители рода *Proteus* более чувствительны к ципрофлоксацину – 88%, азтреонаму – 84%, цефтазидиму – 81% изолятов, в 80% случаев к офлоксацину. Наблюдались существенные различия в спектре чувствительности индол-позитивных (*P. vulgaris*) и индол-негативных (*P. mirabilis*) изолятов протей к  $\beta$ -лактамным антибиотикам. Так, индол-положительные изоляты были в 100% случаев резистентны к амоксициллину и его комбинации с клавулановой кислотой, в то время, как только 27% индол-отрицательных изолятов протей показали резистентность *in vitro*. Более низкую резистентность индол-положительные, по сравнению с индол-отрицательными изолятами показали для других антибиотиков соответственно: цефотаксим (31% и 9%), цефтазидим (29% и 9%), имипенем (43% и 9%), азтреонам (23% и 9%). Для аминогликозидов и фторхинолонов эти различия были не существенны.

Все выделенные изоляты клебсиелл были в 100% случаев чувствительны к имипенему и ципрофлоксацину, в 92% – к амикацину и ко-тримоксазолу, в 91% – к офлоксацину, в 83% – к нетилмицину, в 82% – к комбинации тикарциллин+клавуланат и азтреонаму.

Изоляты рода *Enterobacter* были высокочувствительны (100%) к имипенему, амикацину, офлоксацину, ципрофлоксацину, ко-тримоксазолу. Несколько менее чувствительны (83% изолятов) к цефотаксиму, гентамицину, нетилмицину.

Псевдомонады проявляли очень высокую резистентность к антимикробным препаратам: так, только 60% изолятов была чувствительна к имипенему, 53% к амикацину. Чувствительность к другим препаратам, включая антипсевдомонадные пенициллины, была менее 10%.

На основании полученных данных о чувствительности отдельных представителей микрофлоры, выделенной от пациентов, а также данных о фармакокинетике и фармакодинамике антимикробных препаратов представлена схема эмпирической терапии с учетом способности возбудителей формировать БП (табл.11.4).

Таблица 11.4 – Схема эмпирической антибиотикотерапии гнойно-некротических поражений мягких тканей и гангрены нижних конечностей у пациентов с сахарным диабетом с учетом способности возбудителей формировать биопленку

	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	АБ с учетом образования БП
<i>Staphylococcus spp.</i>	ванкомицин цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин); цефотаксим	фторхинолоны; карбапенемы	ципрофлоксацин, тигециклин
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	цефотаксим	фторхинолоны; карбапенемы	тигециклин
<i>Pseudomonadaceae spp.</i>	амикацин	колистин	фторхинолоны
<i>Streptococcus spp.</i>	ампициллин; цефалотин	ванкомицин; цефуросим; пенициллин	ципрофлоксацин
<i>Enterobacteriaceae spp.</i> + <i>Staphylococcus spp.</i>	фторхинолон + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин)	карбапенемы	ципрофлоксацин, тигециклин
состав микрофлоры не известен	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин)	фторхинолон + цефазолин или цефалотин; карбапенемы	фторхинолоны + тигециклин
имеются клинические признаки анаэробной инфекции	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол	фторхинолон + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол; карбапенемы	фторхинолоны 4 поколения + тигециклин

### 11.3 Идентификация и определение чувствительности антибактериальным препаратам возбудителей наиболее распространенных хирургических инфекций

Частота встречаемости различных представителей микрофлоры при гнойно-воспалительных процессах по литературным данным значительно варьирует в зависимости от нозологической формы. Так, стафилококки высеваются в 3,3%-94,8%, энтеробактерии в 6,4%-60,8%, представители псевдомонад в 1,4%-52,9%, анаэробная микрофлора в 7,8-98%. Наиболее часто у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями (ГВЗ) и осложнениями из экзогенных возбудителей выделялись микроорганизмы представители рода *Staphylococcus* (53,2%), представленные в основном *S.aureus* (39,4%), семейств *Enterobacteriaceae* (22,9%) и *Pseudomonadaceae* (16,6%). Значительно реже встречались стрептококки (3,86%) и НГОП, исключая псевдомонады (2,5%).

Большим многообразием характеризовались энтеробактерии, из которых наиболее часто выделялись *Proteus spp.* (7,9%), *E.coli* (4,9%), *Klebsiella spp.* (4,4%), *Enterobacter spp.* (3,8%). Скромное место занимали *M. morganii* (0,6%), *Serratia spp.* (0,5%) и *C. freundii* (0,5%). Спектр экзогенных возбудителей представлен в таблице 11.5.

Таблица 11.5 – Спектр экзогенных возбудителей у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями и осложнениями хирургического профиля

Микрофлора	1. ПТО		2. ПОГВО		3. ГВЗ		P <sub>1-2</sub>	P <sub>2-3</sub>	P <sub>1-3</sub>
	Абс	%	Абс	%	Абс	%			
<i>Staphylococcus spp.</i>	177	53,3	27	43,55	486	53,88	>0,05	>0,05	>0,05
<i>S.aureus</i>	125	37,6	18	29,03	368	40,8	>0,05	>0,05	>0,05
КОС	52	15,7	9	14,52	118	13,08	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	73	21,9	20	32,26	204	22,62	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Proteus spp.</i>	21	6,3	2	3,23	80	8,87	>0,05	<0,05	>0,05
<i>Enterobacter spp.</i>	13	3,9	3	4,84	33	3,66	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Klebsiella spp.</i>	23	6,9	1	1,61	34	3,77	<0,05	>0,05	<0,05
<i>E.coli</i>	10	3	12	19,35	42	4,66	<0,01	<0,01	>0,05
<i>M.morganii</i>	2	0,6	-	-	6	0,67	>0,05	<0,05	>0,05
<i>Serratia spp.</i>	3	0,9	-	-	4	0,44	>0,05	<0,05	>0,05
<i>C.freundii</i>	-	-	2	3,23	4	0,44	>0,05	>0,05	<0,05
<i>L.adecarboxylata</i>	1	0,3	-	-	-	-	>0,05	>0,05	>0,05
<i>P.rettgeri</i>	-	-	-	-	1	0,11	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Pseudomonas spp.</i>	63	18,9	7	11,29	145	16,08	>0,05	>0,05	>0,05
<i>Streptococcus spp.</i>	10	3	3	4,84	37	4,1	>0,05	>0,05	>0,05
НГОП	5	1,5	5	8,06	23	2,55	>0,05	>0,05	>0,05
другие	4	1,2	-	-	7	0,78	>0,05	>0,05	>0,05
Всего изолятов	332	100	62	100	902	100	<0,001	<0,001	<0,001
Всего пациентов	192	-	50	-	554	-	-	-	-

Примечания: 1. *spp.* – все представители данного рода; 2. ПТО – посттравматические осложнения; 3. ПОГВО – послеоперационные гнойно-воспалительные осложнения; 4. ГВЗ – гнойно-воспалительные заболевания.



При сравнении этиологической структуры гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений (табл. 11.5) выявлен ряд различий в частоте встречаемости энтеробактерий. Так, микроорганизмы рода *Proteus* идентифицированы достоверно чаще в группе гнойно-воспалительных заболеваний, по сравнению с пациентами с послеоперационными осложнениями (ПОГВО): 8,8% и 3,2%, соответственно,  $p < 0,05$ ; а клебсиеллы – в группе посттравматических осложнений (ПТО), по сравнению с гнойно-воспалительными заболеваниями и послеоперационными осложнениями (6,9%, 3,7% и 1,6%, соответственно;  $p < 0,05$ ).

*E.coli* (табл. 11.5) присутствовала в гное при послеоперационных осложнениях чаще по сравнению с посттравматическими осложнениями и гнойно-воспалительными заболеваниями (19,35%, 3,01% и 4,66%, соответственно;  $p < 0,01$ ). *M. morganii* и *Serratia spp.* выделялись при гнойно-воспалительных заболеваниях (0,67% и 0,44%, соответственно) и отсутствовали у пациентов с послеоперационными осложнениями ( $p < 0,05$ ), а *C. freundii* встречался при гнойно-воспалительных заболеваниях (0,44%) и не был выявлен в посевах при осложнениях травм ( $p < 0,05$ ).

В период с 1998 по 2012 годы в РНПЦ «Инфекция в хирургии» отмечено увеличение уровней резистентности экзогенной микрофлоры к ряду антимикробных препаратов. Так, увеличилась устойчивость стафилококков к пенициллину (92,96% и 97,5%, соответственно;  $p < 0,05$ ), оксациллину (37,9% и 53,3%;  $p < 0,05$ ), амоксициллину+клавуланату (33,3% и 52%;  $p < 0,05$ ), ампициллину+сульбактаму (27,16% и 46,3%;  $p < 0,05$ ), канамицину (50,5% и 50,6%;  $p > 0,05$ ), тетрациклину (64,6% и 66%;  $p > 0,05$ ), пефлоксацину (21,1% и 24,9%;  $p > 0,05$ ); энтеробактерий к амоксициллину (82,3% и 87,8%;  $p < 0,05$ ), амоксициллину+клавуланату (62,2% и 82,9%;  $p < 0,05$ ), цефалотину (63,44% и 79,31%;  $p < 0,05$ ), цефокситину (37,9% и 40%;  $p > 0,05$ ), канамицину (44,66% и 92%;  $p < 0,05$ ), гентамицину (34,8% и 44,4%;  $p < 0,05$ ), тетрациклину (74,59% и 88%;  $p < 0,05$ ), левомицетину (59,4% и 78,8%;  $p < 0,05$ ), ципрофлоксацину (11,04% и 19,35%;  $p < 0,05$ ); псевдомонад к цефтазидиму (63,95% и 100%;  $p < 0,05$ ), гентамицину (67,39% и 70,73%;  $p > 0,05$ ).

Стафилококки стали за этот период времени менее устойчивы к амикацину (35,6% и 20,6%;  $p < 0,05$ ), гентамицину (38,9% и 30,84%;  $p < 0,05$ ), нетромицину (27,9% и 16,27%;  $p < 0,05$ ), линкомицину (66,56% и 48,55%;  $p < 0,05$ ), рифампицину (28,42% и 15,27%;  $p < 0,05$ ); энтеробактерии к тикарциллину (57,65% и 46,67%;  $p < 0,05$ ), пиперациллину (33,7% и 25%;  $p < 0,05$ ), цефотаксиму (33,9% и 10,71%;  $p < 0,05$ ), пефлоксацину (21,33% и 14,3%;  $p < 0,05$ ), офлоксацину (18,4% и 9,4%;  $p < 0,05$ ); псевдомонады к азтреонаму (67, % и 43,5%;  $p < 0,05$ ), амикацину (27,6% и 12,8%;  $p < 0,05$ ) и ко-тримоксазолу (89,3% и 85,7%;  $p > 0,05$ ).

К ряду антибиотиков устойчивость микрофлоры практически не изменилась: у стафилококков к имипенему, меропенему, канамицину, эритромицину, клиндамицину, офлоксацину, ципрофлоксацину,

ванкомицину; у энтеробактерий к имипенему, азтреонаму и цефтазидиму; у псевдомонад к имипенему, нетромицину, пefлоксацину, цiproфлoксацину. Зафиксированный рост устойчивости к отдельным препаратам связан с более интенсивным их использованием в лечебном процессе, а снижение резистентности и относительно стабильные её уровни – с более рациональным применением антибиотиков.

По критерию резистентности к 5 и более препаратам из разных групп изоляты микроорганизмов относились к высоко-резистентным (ВРИ), частота встречаемости которых при различных нозологических формах представлена в таблице 11.6.

Таблица 11.6 – Частота встречаемости высоко-резистентных изолятов у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями и осложнениями

	<i>S.aureus</i>	КОС	<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
Гнойные раны	92	66,67	70	80
Фурункулы, фурункулёз, карбункулы	77,78	66,67	0	0
Абсцессы	46,67	50	70	50
Флегмоны	48,28	70	60	83,33
Трофические язвы	77,78	100	88	86,49
Гематогенный остеомиелит	53,85	60	100	93,33
Посттравматический остеомиелит	67,5	92	68,29	68,57
Послеоперационные осложнения	66,67	100	46,15	100

ВРИ золотистого стафилококка достоверно чаще встречались при посттравматических гнойных ранах, по сравнению с абсцессами, флегмонами, гематогенным и посттравматическим остеомиелитом, а энтеробактерий – только по сравнению с гематогенным остеомиелитом ( $p < 0,05$ ).

Экзогенные возбудители характеризовались множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам, а частота встречаемости ВРИ варьировала от 46,1% до 100% в зависимости от вида микроорганизма и нозологической формы.

При проведении мониторинга антибиотикорезистентности анаэробной микрофлоры от пациентов с изученными нозологическими формами идентифицированы, определена чувствительность к антибиотикам 92 представителей строгих анаэробов: 28 представителей рода *Bacteroides* (30,4%), из которых наиболее часто встречался *B.fragilis* – 23 изолята (25%); по 20 представителей *Peptococcus spp.* и *Peptostreptococcus spp.* (21,7%), 12 представителей рода *Prevotella* (13%), 8 представителей рода *Fusobacterium* (8,7%).

Недифференцированные неспорообразующие грамположительные анаэробные палочки (рис. 11.1) выделены в 4 случаях (4,3%). Представители анаэробной флоры высевались при всех нозологических формах, исключая фурункулы, фурункулёз и карбункулы, причём в 81,5% входили в состав ассоциаций с аэробами, что свидетельствует о смешанном аэробно-анаэробном характере хирургических инфекций.

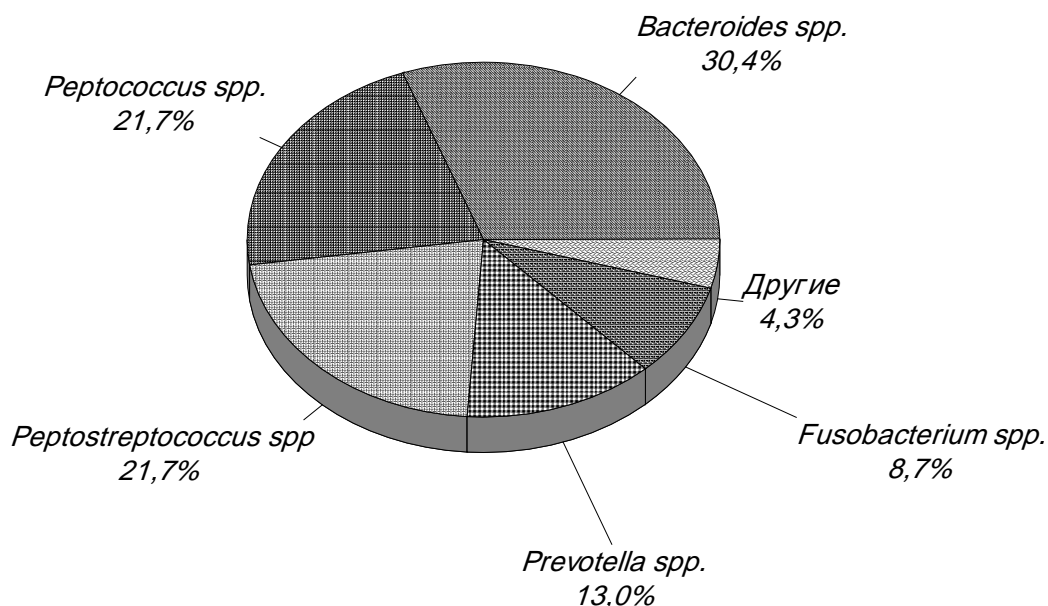


Рисунок 11.1 – Спектр анаэробной флоры у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями и осложнениями

Представители анаэробной флоры высевались при всех нозологических формах, исключая фурункулы, фурункулёз и карбункулы, причём в 81,5% входили в состав ассоциаций с аэробами, что свидетельствует о смешанном аэробно-анаэробном характере хирургических инфекций.

Таким образом, учитывая, что в настоящее время не отмечается достоверного роста резистентности анаэробной микрофлоры к антибиотикам, данные микроорганизмы крайне неустойчивы во внешней среде, в связи с чем отсутствует возможность распространения резистентных изолятов и существуют препараты, проявляющие высокую эффективность против анаэробов в течение длительного времени, проведение антибактериальной терапии анаэробной инфекции не вызывает значительных трудностей. В то же время является весьма проблемным проведение антибиотикотерапии хирургических инфекций, вызванных экзогенными аэробными и факультативно-анаэробными, часто нозокомиальными микроорганизмами, которые характеризуются многообразием возбудителей, способностью передачи от пациента к пациенту и медработника к пациенту, низкой чувствительностью к антибиотикам, высокими темпами роста резистентности, множественной устойчивостью, а также способностью формировать БП [372]. Это диктует

необходимость детального изучения этиологической структуры данных экзогенных возбудителей и их резистентности к антибиотикам с последующей разработкой схем рациональной антибиотикотерапии с учетом способности возбудителя образовывать биопленку.

#### 11.4 Фурункулы, фурункулез и карбункулы

От 84 пациентов с фурункулами, фурункулёзом и карбункулами выделено 85 (92,4%) микроорганизмов представителей рода *Staphylococcus*, 3 изолята (3,3%) *K.pneumoniae*, 2 изолята (2,2%) *P.aeruginosa* и 2 изолята (2,2%) *A. baumannii*.

Стафилококки были представлены *S.aureus* – 73 изолята (79,4%) и КОС – 12 (13%). Последние были идентифицированы как *S.epidermidis* – 9 изолятов (9,8%). *S.chromogenes*, *S.hominis*, *S.simulans* выделялись по одному изоляту (3,3%). Отрицательные результаты при первичных посевах получены при исследовании микрофлоры в 5 случаях (рис. 11.2).

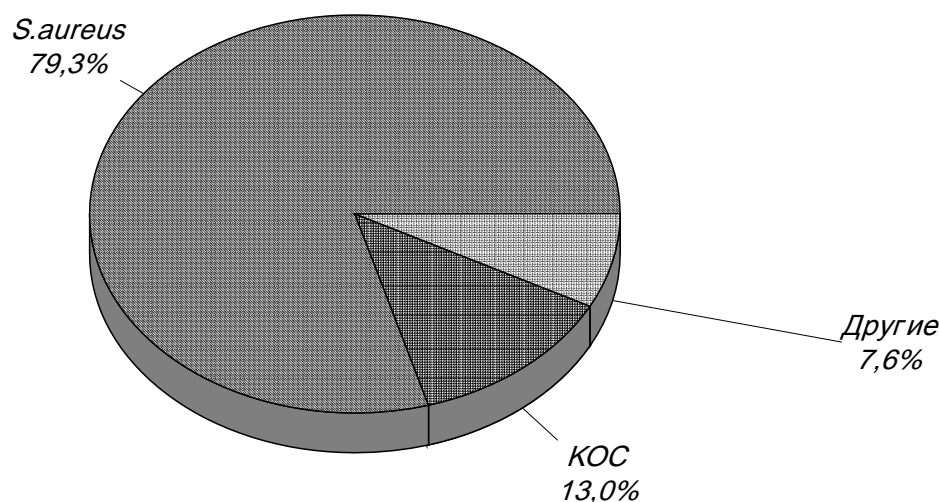


Рисунок 11.2 – Спектр микробной флоры у пациентов с фурункулами, фурункулёзом и карбункулами

В 86,96% случаев (80 изолятов) выделялся только один вид бактерий, а в 13% (12 изолятов) обнаружены микробные ассоциации (табл. 11.7).

Таблица 11.7 – Ассоциации микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с фурункулами, фурункулёзом, карбункулами

Ассоциация	Количество	Вероятность формирования БП
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	2	50-80%
<i>S.aureus</i> + <i>A. baumannii</i>	2	70-100%
<i>S.aureus</i> + <i>K.pneumoniae</i>	2	70-100%
Всего	6	

Изоляты *S.aureus* оказались наименее утойчивы к цефалотину (0%), меропенему (0%), имипенему (2,56%), пefлоксацину (3,13%), цефазолину (4,2%), цефотаксиму (5%), офлоксацину (6,06%), норфлоксацину (11,1%),

ципрофлоксацину (11,1%), нетромицину (11,1%), ванкомицину (13,2%), гентамицину (17,6%), амикацину (18,9%), клиндамицину (19,44%), рифампицину – 20% устойчивых изолятов. Более высокий уровень резистентности был определен к линкомицину (27%), доксициклину (29,1%), амоксициллину+клавуланату (38,2%), ампициллину+сульбактаму (40%), канамицину (40%), оксациллину (41%), тетрациклину (46,1%), эритромицину (50%), ко-тримоксазолу (61,1%), хлорамфениколу – 63,6% устойчивых изолятов. Высокую резистентность изоляты *S.aureus* продемонстрировали к пенициллину (97,2%), азитромицину – 100% устойчивых изолятов (рис. 11.3).

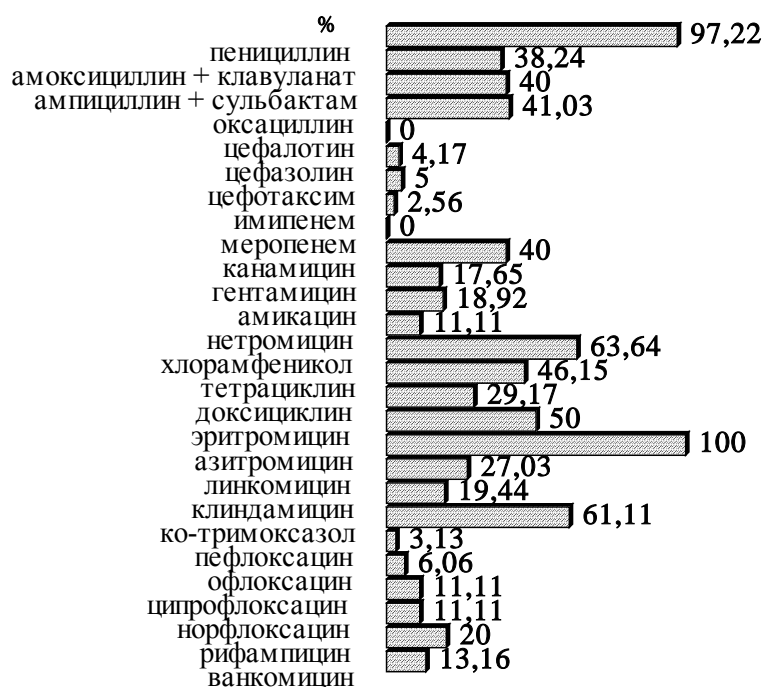


Рисунок 11.3 – Резистентность *S.aureus* к антибиотикам у пациентов с фурункулами, фурункулёзом, карбункулами

КОС оказались наименее устойчивы к имипенему (0%), меропенему (0%), офлоксацину (0%), ципрофлоксацину (0%), рифампицину (0%), ванкомицину (0%), ампициллину+сульбактаму (0%), гентамицину (16,7%), нетромицину (33,3%), канамицину (33,3%), цефазолину (33,3%), амикацину (40%), доксициклину – 40% устойчивых изолятов. Более высокий уровень резистентности оказался к хлорамфениколу (50%), клиндамицину (62,5%), амоксициллину+клавуланату (66,7%), ко-тримоксазолу (66,7%), линкомицину (75%), тетрациклину (80%), оксациллину – 80% устойчивых изолятов. Высокая степень резистентности была выявлена к эритромицину (87,5%), азитромицину (100%), пенициллину – 100% резистентных изолятов (рис. 11.4).

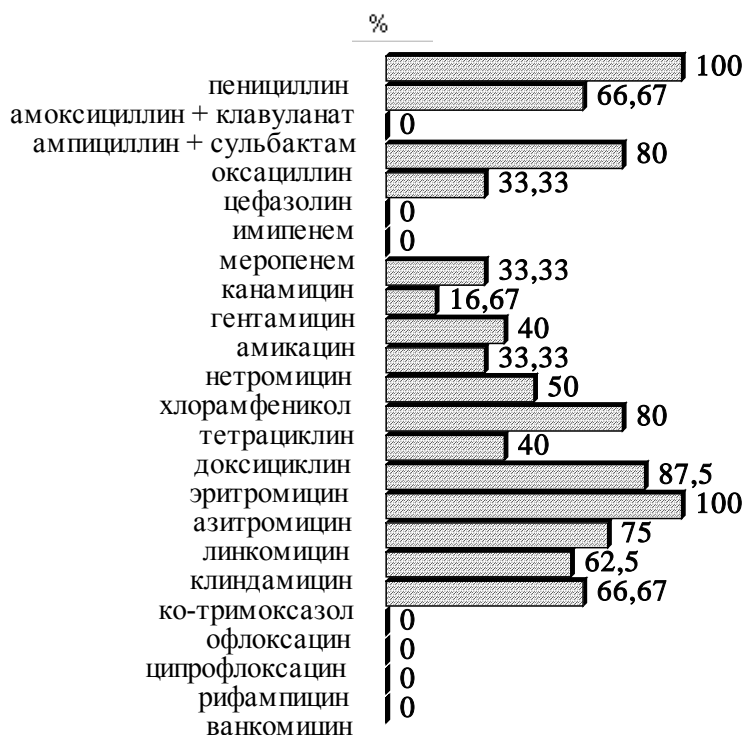


Рисунок 11.4 – Резистентность КОС к антибиотикам у пациентов с фурункулами, фурункулёзом, карбункулами

По сравнению с золотистым стафилококком КОС оказались достоверно более резистентны ( $p < 0,05$ ) к клиндамицину, эритромицину, а *S. aureus* показал более высокую резистентность к ципрофлоксацину, ванкомицину, рифампицину, ампициллину+сульбактаму по отношению к КОС [373].

На основании полученных данных разработана схема эмпирической антибиотикотерапии при фурункулах, фурункулёзе и карбункулах (табл.11.8).

Таблица 11.8 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с фурункулами, фурункулёзом, карбункулами с учетом способности возбудителей формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>S. aureus</i>	цефалоспорины 1 поколения (цефалотин, цефазолин); цефотаксим	ванкомицин; фторхинолоны (офлоксацин, пefлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин); клиндамицин	линезолид тигекциклин
КОС	цефазолин; ампициллин+сульбактам	ванкомицин; фторхинолоны (офлоксацин, пefлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин)	линезолид тигекциклин

У пациентов с фурункулами челюстно-лицевой области выделено 38 изолятов стафилококков (92,5%), а также по 1 изоляту *P.aeruginosa* (2,5%), *A. sobria* (2,5%), *P. mirabilis* (2,5%).

Состав стафилококков-возбудителей значительно отличался от других инфекционно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области. В 89,4% случаев выделен *S. aureus*. КОС (10,5%) были представлены следующими видами: *S. equorum* – 5,2%, *S. sciuri* – 2,6% и *S. chromogenes* – 2,6% (рис.11.5).

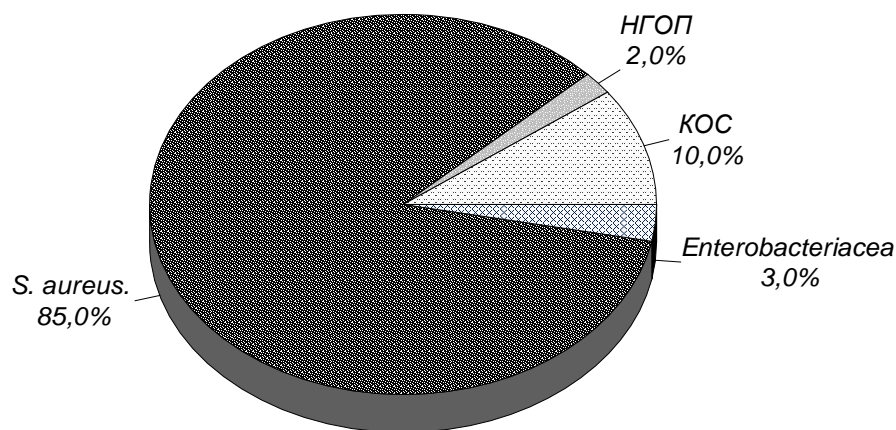


Рисунок 11.5 – Спектр микробной флоры у пациентов с фурункулами челюстно-лицевой области

Таким образом, ведущую роль в развитии фурункулов челюстно-лицевой области, как и другой локализации, играет золотистый стафилококк: 85% и 79%, соответственно.

При фурункулах челюстно-лицевой области выявлено 36% метициллин-резистентных изолятов стафилококков. Выделенные стафилококки продемонстрировали следующий уровень антибиотикорезистентности: к ванкомицину – 0%, норфлоксацину – 0%, к цефалотину – 4,5%, к рифампицину – 10%, к ципрофлоксацину – 10%, к офлоксацину – 13,6%, к цефотаксиму – 20%, к новобиоцину – 20%, к цефазолину – 22,2%, к гентамицину – 22,2%, к пристинамицину – 22,2%, к амикацину – 30%, к нетилмицину – 42,4%, к тобромицину – 33,3%, к котримаксозолу – 33,3%, к клиндамицину – 33,3%, к тейкопланину – 36,3%, к линкомицину – 36,3%, к канамицину – 37,5%, к доксициклину – 38,5%, к миноциклину – 40%, к пефлоксацину – 41,6%, к меропенему – 42,8%, к нитрофурантоину – 42,8%, к цефепиму – 42,8%, к эритромицину – 42,8%, к ампициллину+сульбактаму – 57,2%, к амоксициллину+клавуланату – 62%, к тетрациклину – 70 %, к фосфомицину – 72,8%, к хлорамфениколу – 91,6%, к азитромицину – 100%, к пенициллину – 100 %, к имипенему – 100% (рис.11.6).

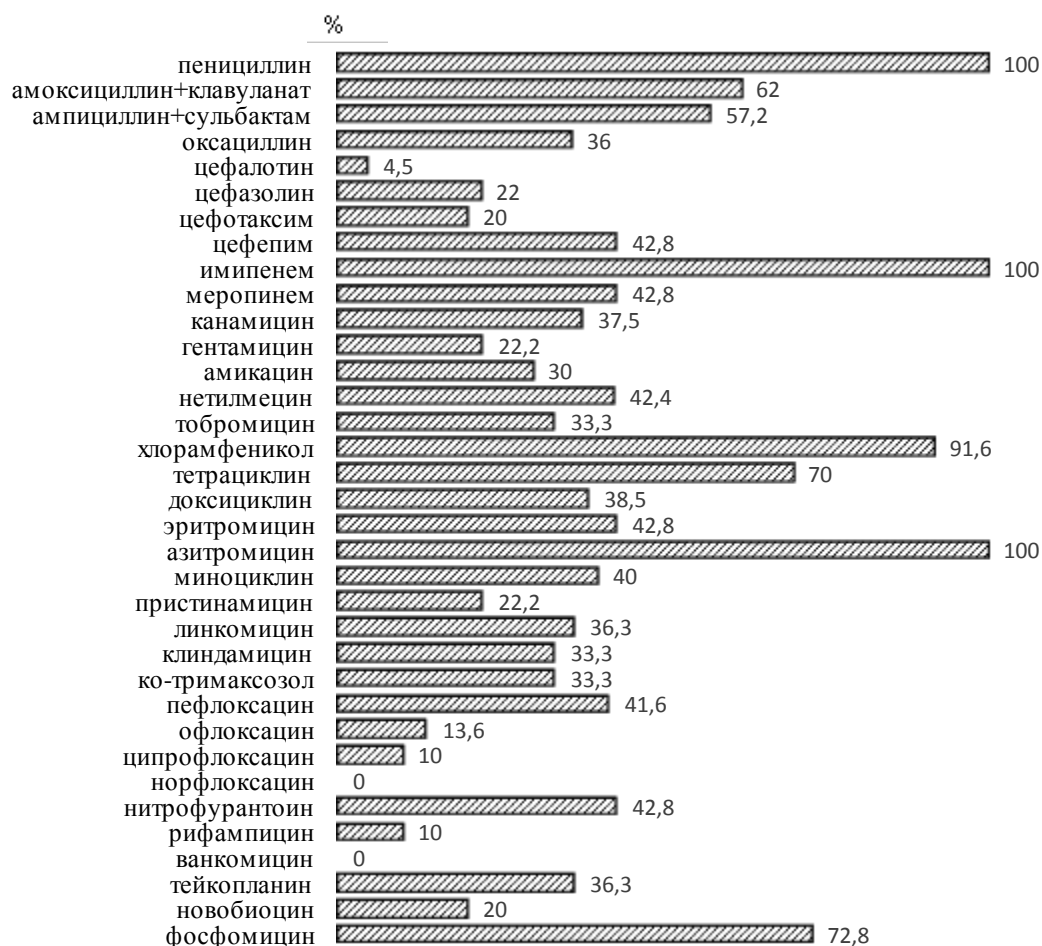


Рисунок 11.6 – Резистентность стафилококков к антибиотикам у пациентов с фурункулами челюстно-лицевой области

На основании полученных данных разработана схема эмпирической антибиотикотерапии при фурункулах челюстно-лицевой области с учетом способности возбудителей формировать биопленку (табл.11.9).

Таблица 11.9 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с фурункулами челюстно-лицевой области с учетом способности возбудителей формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>MSSA</i>	цефалотин, цефотаксим, цефазолин	ванкомицин	ципрофлоксацин, тигекциклин
<i>MRSA</i>	ванкомицин	ноर्फлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин	тигекциклин, линезолид



## 11.5 Абсцессы

От 83 пациентов с абсцессами выделено 67 (73,6%) микроорганизмов представителей рода *Staphylococcus*, 10 изолятов (11 %) семейства *Enterobacteriaceae*, 8 изолятов (8,8%) представителей рода *Streptococcus*, 4 изолята (4,4%) *P.aeruginosa* и 2 изолята *A. sobria* (2,2%). Отрицательные результаты первичных посевов получены при исследовании микрофлоры в 12 случаях. В 72,5% случаев (66 изолятов) выделялся только один вид бактерий, а в 27,5% (25 изолятов) микробные ассоциации.

Наиболее часто встречающиеся микробные ассоциации у пациентов с абсцессами и вероятность формирования ими БП представлены в таблице 11.10.

Таблица 11.10 – Ассоциации микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с абсцессами

Ассоциация	Количество	Вероятность формирования БП
<i>S.aureus</i> + <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	5	90-100%
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1	50-80%
<i>S.aureus</i> + <i>S.mitis</i>	1	50-70%
<i>S.capitis</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1	50-80%
<i>S.sciuri</i> + <i>K.oxytoca</i>	1	90-100%
<i>S.hominis</i> + <i>A. sobria</i>	1	50-70%
<i>E.coli</i> + <i>E.sakazakii</i>	1	90-100%
<i>S.aureus</i> + <i>S.pyogenes</i> + <i>K.ornithinolytica</i>	1	80-100%
Всего	12	

Наиболее распространённой ассоциацией у лиц с абсцессами (табл. 11.11) было сочетание *S.aureus* с энтеробактериями (41,6%).

Таблица 11.11 – Спектр наиболее часто выделяемых микроорганизмов у пациентов с абсцессами в зависимости от локализации процесса

Микрофлора	Голова, шея, грудь		Брюшная стенка, н/конечности		p
	Абс.	Отн.%	Абс.	Отн.%	
<i>Staphylococcus</i> spp.	31	86,11	36	65,45	<0,05
<i>S.aureus</i>	28	77,78	30	54,55	<0,05
KOC	3	8,33	6	10,91	>0,05
<i>Enterobacteriaceae</i> spp	1	2,78	9	16,36	<0,05
<i>Klebsiella</i> spp.	-	-	6	10,91	<0,05
<i>P.mirabilis</i>	1	2,78	-	-	>0,05
<i>E. sakazakii</i>	-	-	1	1,82	>0,05
<i>E.coli</i>	-	-	2	3,64	>0,05
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	2,78	3	5,45	>0,05
<i>A. sobria</i>	-	-	2	3,64	>0,05
<i>Streptococcus</i> spp.	3	8,33	5	9,09	>0,05
Всего изолятов	68	100	100	100	>0,05

Стафилококки были представлены *S.aureus* – 58 изолятов (63,7%) и КОС – 9 (9,9%). Последние были идентифицированы как *S.epidermidis* – 4 изолята (4,4%); *S.capitis*, *S.equorum*, *S.hominis*, *S.sciuri*, *S.xylosus* выделялись только по 1 изоляту (1,1%).

Энтеробактерии были представлены *K.oxytoca* – 4 изолята (4,4%), *K.pneumoniae* – 1 (1,1%), *K.ornithinolytica* – 1 (1,1%), *E.coli* – 2 изолята (2,2%), *P.mirabilis* – 1 (1,1%), *E.sakazakii* – 1 (1,1%).

Род *Streptococcus* был представлен *S.pyogenes* – 7 изолятов (7,7%) и *S.mitis* – 1 (1,1%). Спектр микробной флоры при абсцессах различной локализации представлен на рисунке 11.7.

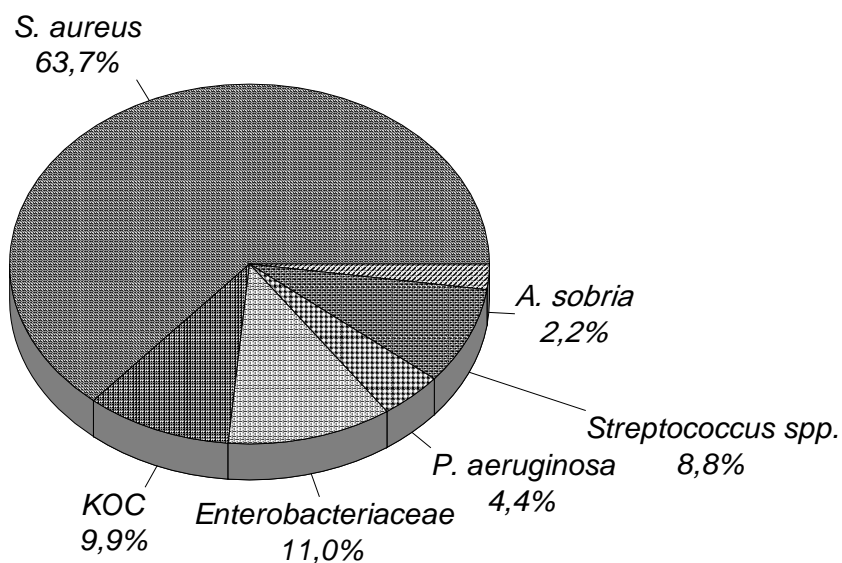


Рисунок 11.7 – Спектр микробной флоры у пациентов с абсцессами

При локализации гнойно-воспалительного процесса на голове, шее, груди отмечалось более частое присутствие стафилококков, в основном золотистого, по сравнению с передней брюшной стенкой, нижними конечностями. Энтеробактерии же наоборот высевались из гнойников брюшной стенки, нижних конечностей чаще, причём клебсиеллы являлись причиной абсцессов только данной локализации.

Изоляты *S.aureus* оказались наименее резистентны к меропенему (0%), цефазолину (0%), цефотаксиму (0%), офлоксацину (0%), пефлоксацину (0%), ципрофлоксацину (0%), рифампицину (0%), доксициклину (0%), имипенему (2,7%), нетромицину (6,7%), цефалотину (7,4%), норфлоксацину (11,1%), ванкомицину (13,6%), клиндамицину (16,7%), амикацину (17,8%), гентамицину (23,5%), оксациллину (26,1%), эритромицину (30,7%), канамицину – 30,7 % резистентных изолятов. Более высокий уровень устойчивости был продемонстрирован к линкомицину (33,3%), хлорамфениколу (37,5%), амоксициллину+клавуланату (38,5%), ампициллину+сульбактаму (40%), тетрациклину – 44,4% устойчивых изолятов.

Наибольшая устойчивость изолятов *S.aureus* выявлена к пенициллину (100%), азитромицину – 100% резистентных изолятов (рис. 11.8).



Рисунок 11.8 – Резистентность *S.aureus* к антибиотикам у пациентов с абсцессами

КОС оказались наименее устойчивы к имипенему (0%), меропенему (0%), цефалотину (0%), офлоксацину (0%), пефлоксацину (0%), рифампицину (0%), клиндамицину (0%), амикацину (12,5%), ципрофлоксацину (14,3%), оксациллину (14,3%), амоксициллину+клавуланату(20%), ампициллину+сульбактаму (20%), ванкомицину (20%), канамицину (25%), гентамицину (30%), норфлоксацину – 33,3% устойчивых изолятов.

Более высокий уровень резистентности определен к нетромицину (40%), хлорамфениколу (40%), линкомицину (50%), эритромицину (55,6%), тетрациклину (60%), пенициллину – 80% резистентных изолятов (рис. 11.9).

По сравнению с КОС изоляты золотистого стафилококка оказались достоверно более резистентны к клиндамицину.

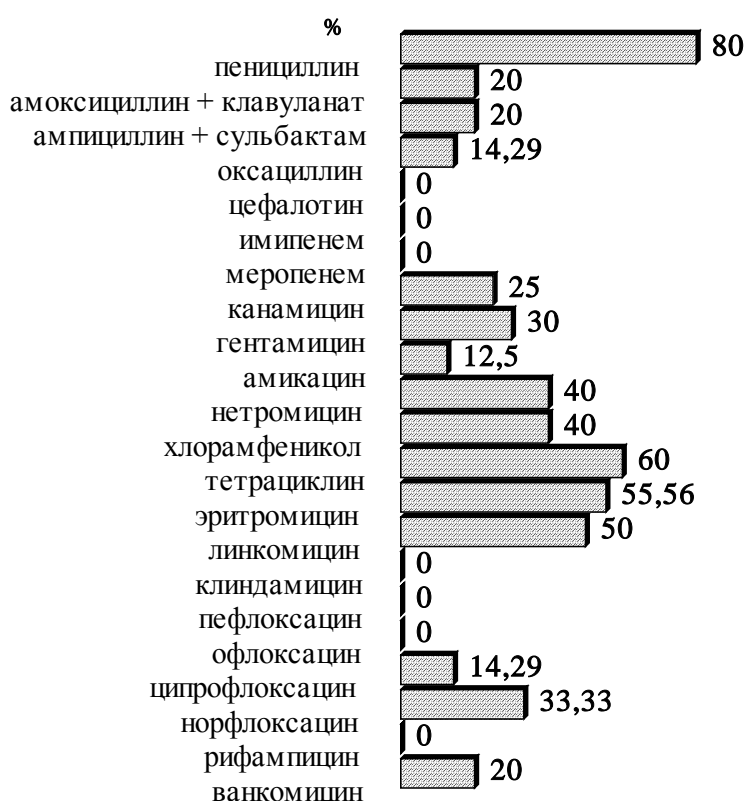


Рисунок 11.9 – Резистентность КОС к антибиотикам у пациентов с абсцессами

Изоляты энтеробактерий продемонстрировали наименьшую устойчивость к имипенему (0%), ципрофлоксацину (0%), офлоксацину (11,1%), пефлоксацину (14,3%), пиперациллину (16,6%), амикацину (20%), цефотаксиму (20%), цефтазидиму (28,5%), гентамицину (30%), ко-тримоксазолу (30%), азтреонаму – 33,3% резистентных изолятов. Более высокий уровень резистентности был выявлен к нетромицину (40%), тетрациклину (42,9%), канамицину (55,6%), тикарциллину (57,1%), цефалотину (57,1%), хлорамфениколу (66,7%), цефокситину (66,7%), цефуроксиму (66,7%), мециллиnamу – 66,67% устойчивых изолятов. Высокая степень устойчивости была выявлена к амоксициллину+клавуланату (70%) и амоксициллину – 90% резистентных изолятов (рис. 11.10.).

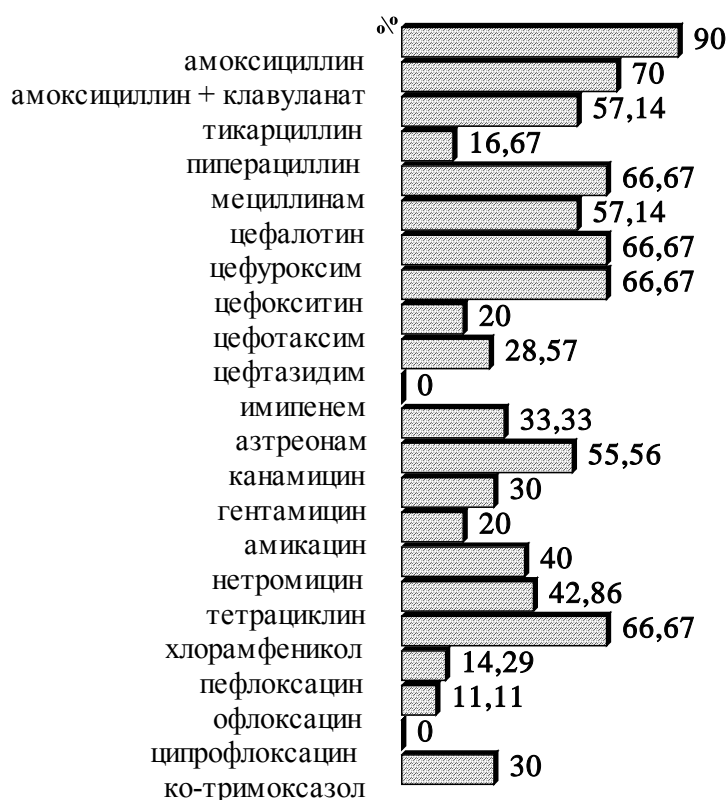


Рисунок 11.10 – Резистентность энтеробактерий к антибиотикам у пациентов с абсцессами

Изоляты псевдомонад оказались наименее резистентны к имипенему (0%), амикацину (0%), гентамицину (25%), пиперациллину – 33,3% устойчивых изолятов. Высокий уровень устойчивости выявлен к тикарциллину (50%), цефтазидиму (50%), азтреонаму (66,7%), ципрофлоксацину (66,7%), нетромицину (75%), пефлоксацину (75%), ко-тримоксазолу – 100% резистентных изолятов (рис.11.11).

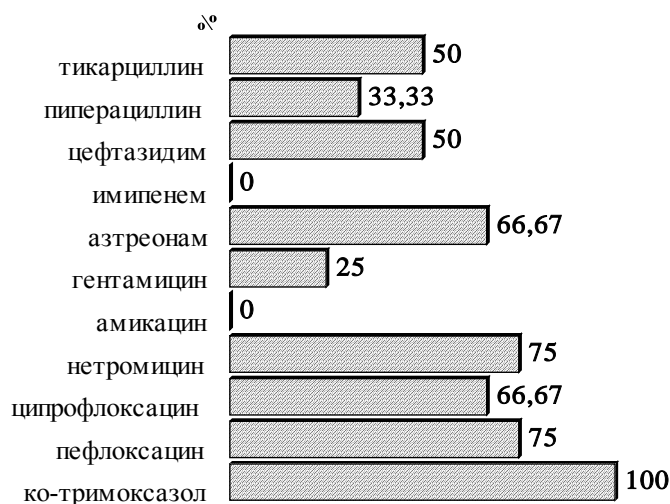


Рисунок 11.11 – Резистентность псевдомонад к антибиотикам у пациентов с абсцессами

Стрептококки продемонстрировали низкую резистентность к ванкомицину (0%), цефалотину (0%), стрептомицину (0%), ко-тримоксазолу (0%), канамицину (14,3%), пенициллину (14,3%), ампициллину (14,3%), цефуросиму (14,3%), эритромицину (14,3%), рифампицину (14,3%), гентамицину (14,3%), линкомицину – 28,5% устойчивых изолятов. Высокая резистентность выявлена к оксациллину (57,1%), тетрациклину – 57,1% устойчивых изолятов (рис.11.12).

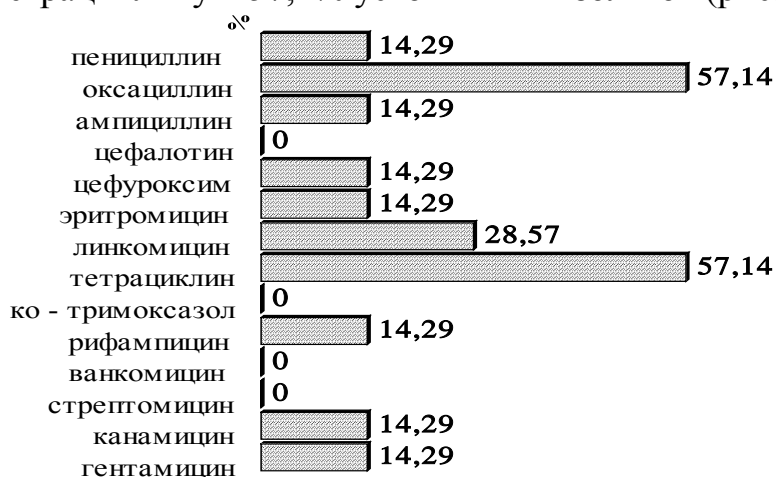


Рисунок 11.12 – Резистентность стрептококков к антибиотикам у пациентов с абсцессами

На основании данных об этиологической структуре и резистентности микрофлоры к антибиотикам разработана схема рациональной эмпирической антибиотикотерапии пациентов с абсцессами с учетом способности возбудителей формировать БП (табл. 11.12).

Таблица 11.12 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с абсцессами с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>S. aureus</i> (более частое присутствие на голове, шее, груди)	цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин); эритромицин; цефотаксим	ванкомицин; фторхинолоны; карбапенемы (имипенем, меропенем)	тигециклин, ципрофлоксацин
КОС	цефалоспорины 1 поколения (цефалотин); оксациллин	ванкомицин; фторхинолоны (офлоксацин, пefлоксацин); карбапенемы (имипенем, меропенем)	тигециклин, линезолид
<i>Enterobacteriaceae spp.</i> (более частое присутствие на брюшной стенке, н/конечностях)	аминогликозиды (амикацин, гентамицин); ко-тримоксазол; цефотаксим	фторхинолоны (ципрофлоксацин, офлоксацин, пefлоксацин); цефтазидим; карбапенемы	тигециклин
<i>Streptococcus spp.</i>	амикацин; гентамицин	цефтазидим; карбапенемы (имипенем, меропенем)	ципрофлоксацин
<i>Pseudomonadaceae spp.</i>	амикацин + цефалоспорины 1 поколения (цефалотин)	фторхинолон + цефтазидим; карбапенемы	колистин
<i>S.aureus</i> + <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	амикацин + цефалоспорин 1 поколения; амикацин + цефотаксим или цефтазидим	фторхинолон + цефазолин или цефалотин; карбапенемы	тигециклин, ципрофлоксацин
состав микрофлоры не известен	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол	фторхинолон + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол	тигециклин
имеются клинические признаки анаэробной инфекции	метронидазол+ клиндамицин	фторхинолоны 4 поколения, карбапенемы (имипенем, меропенем)	тигециклин + фторхинолоны 4 поколения

При абсцессах челюстно-лицевой области различной локализации выделено 11 изолятов стрептококков (20%), 37 изолятов стафилококков (68%), 3 изолята бацилл (6%), 3 изолята энтеробактерий (6%).

Стрептококки у пациентов с данной патологией идентифицированы как *Streptococcus spp.* (9,99%),  $\beta$ -гемолитический стрептококк (23,33%),  $\alpha$ -гемолитический стрептококк (9,99%), негемолитический стрептококк (6,66%). С помощью тест-систем идентифицированы *S. anginosus* (9,99%), *S. pyogenes* (3,33%), *S. salivarius* (3,33%), *S. sanguis* (3,33%), *S. disgalactical* (3,33%). Кроме того, идентифицированы *Leuconostoc spp.* (9,99%), *A. viridans* (3,33%), *E. faecalis* (3,33%), *L. lactis* (3,33%). Среди стафилококков-возбудителей абсцессов идентифицированы *S. aureus* (5,4%), КОС – 94,6%, среди которых *S. epidermidis* (32,43% изолятов), *S. chromogenes* (16,22%), *S. hominis* (13,51%), *S. sciuri* (10,81%), *S. xylosus* (8,11%), *S. capitis* (5,4%), *S. equorum* (2,7%), *S. lentus* (2,7%), *S. warneri* (2,7%). У пациентов с абсцессами челюстно-лицевой области выделены бациллы: *Bacillus spp.*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*; энтеробактерии – *E. coli*, *K. pneumonia* (рис.11.13).

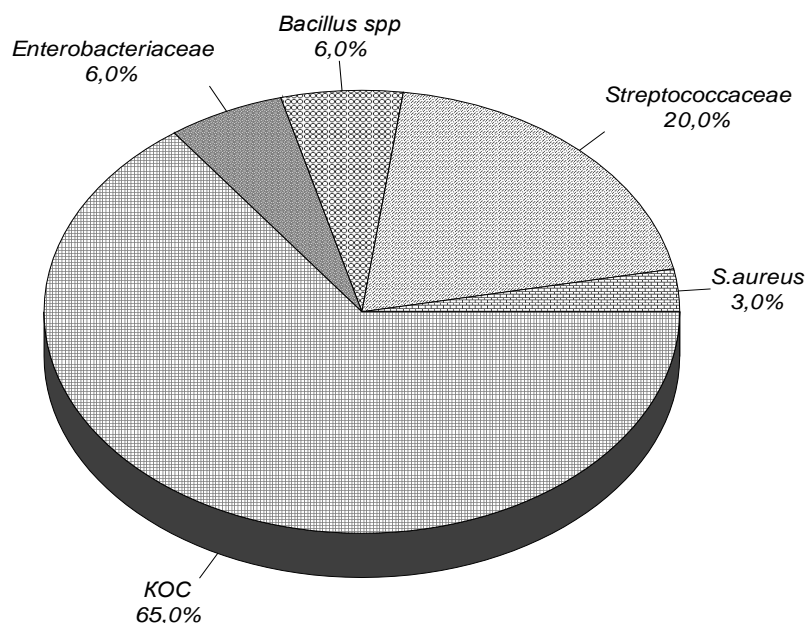


Рисунок 11.13 – Спектр микробной флоры у пациентов с абсцессами челюстно-лицевой области

Выявлены существенные отличия структуры микробной флоры при развитии абсцессов челюстно-лицевой области и другой локализации. Так, ведущую роль в развитии абсцессов в области головы и шеи играет КОС и стрептококки, тогда как в других анатомических областях – золотистый стафилококк. Это может быть связано с преимущественной одонтогенной этиологией абсцессов челюстно-лицевой области.

При абсцессах челюстно-лицевой области стрептококки (рис. 11.14) проявили наименьшую резистентность к рифампицину (7,4%), ампициллину (14,9%), цефалотину (15%), нитрофурантоину (22,2%),



ванкомицину (25,0%), тейкопланину (28,6%). Более высокий уровень устойчивости выявлен к линкомицину (38%), цефуроксиму (40%), эритромицину (43%), тетрациклину (44%), ко-тримаксозолу (48%), пенициллину (63%), оксациллину (89%), гентамицину (93%), канамицину (96%), стрептомицину (100%).

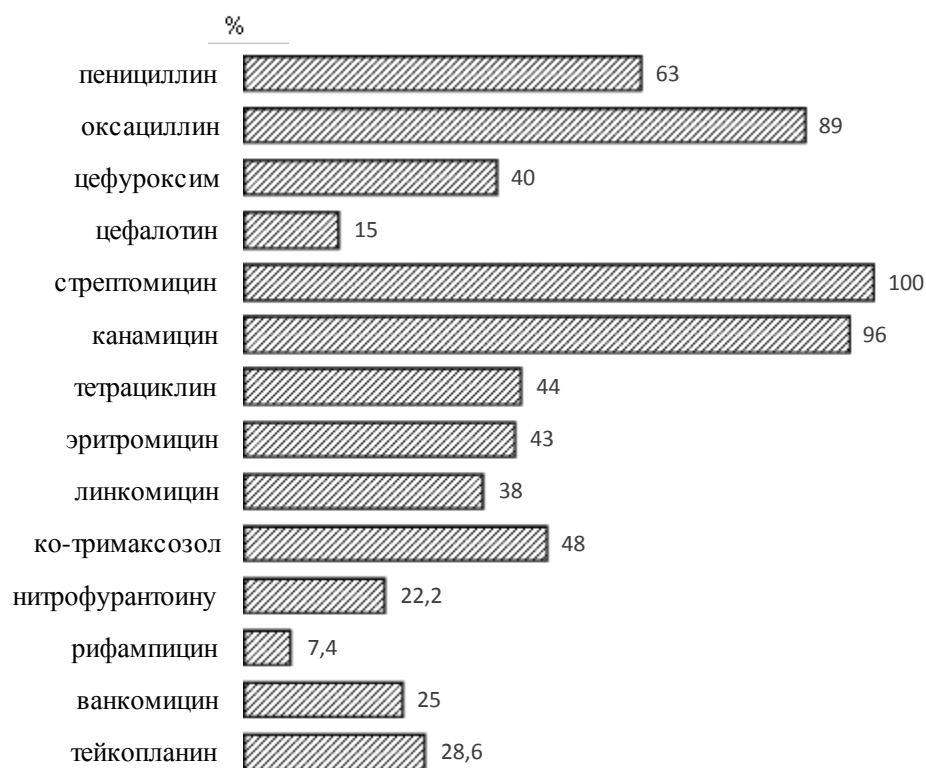


Рисунок 11.14 – Резистентность стрептококков к антибиотикам у пациентов с абсцессами челюстно-лицевой области

При абсцессах челюстно-лицевой области выделено 26,1% метициллин-резистентных изолятов. Стафилококки при абсцессах продемонстрировали следующие показатели резистентности: к ванкомицину – 0%, к ципрофлоксацину – 9%, к гентамицину – 10,7%, к цефалотину – 12,5%, к нитрофурантоину – 15%, к офлоксацину – 15%, к цефазолину – 17%, к рифампицину – 18,2%, к нетилмицину – 20%, к норфлоксацину – 20%, к пефлоксацину – 23,5%, к ко-тримаксозолу – 23,5%, к амикацину – 24%, к канамицину – 25%, к цефотаксиму – 28,6%, к меропенему – 28,6%, к доксициклину – 30%, к пристинамицину – 30%, к ампициллину+сульбактаму – 31,2%, к тобромицину – 33,3%, к клиндамицину – 33,3%, к цефепиму – 33,3%, к амоксициллину+клавуланату – 33,3%, к новобиоцину – 36,4%, к хлорамфениколу – 37,5%, к тетрациклину – 43%, к тейкопланину – 45,5%, к миноциклину – 50%, к фосфомицину – 50%, к эритромицину – 55%, к линкомицину – 58,5%, к пенициллину – 81,2%, к имипенему – 100%, к азитромицину – 100% (рис. 11.15).

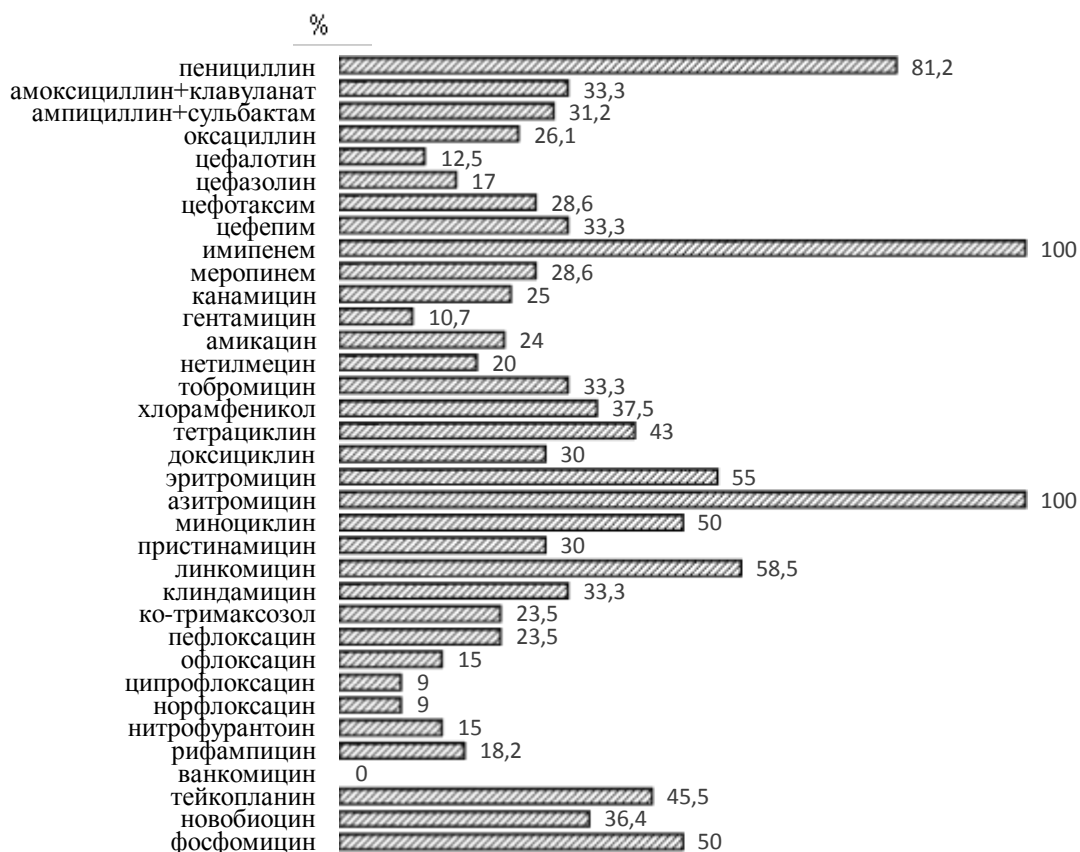


Рисунок 11.15 – Резистентность стафилококков к антибиотикам у пациентов с абсцессами челюстно-лицевой области

На основании данных об этиологической структуре и резистентности микрофлоры к антибиотикам разработана схема рациональной эмпирической антибиотикотерапии абсцессов челюстно-лицевой области с учетом способности возбудителя формировать биопленку (табл. 11.13).

Таблица 11.13 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с абсцессами челюстно-лицевой области с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>MSSA</i>	цефалотин, цефазолин, цефотаксим	ванкомицин	тигециклин
<i>MRSA</i>	ванкомицин	линезолид	ципрофлоксацин, тигециклин
<i>Streptococcus spp.</i>	ампициллин, цефалотин,	ампициллин+ амикацин, ванкомицин, тейкопланин	тигециклин
состав микрофлоры не известен	цефазолин	ванкомицин, тейкопланин	тигециклин

## 11.6 Флегмоны

От 103 пациентов с флегмонами идентифицировано 82 (52,5%) микроорганизма представителя рода *Staphylococcus*, 30 изолятов (19,2%) семейства *Enterobacteriaceae*, 24 изолята (15,4%) рода *Pseudomonas*, 15 изолятов (9,6%) представителей семейства *Streptococcaceae*, 3 изолята НГОП (1,9%) и по одному изоляту *Micrococcus roseus*, *Gemella haemolysans* (1,3%). Отрицательные результаты первичных посевов получены при исследовании микрофлоры в 15 случаях.

Спектр микробной флоры при флегмонах представлен на рисунке 11.16.

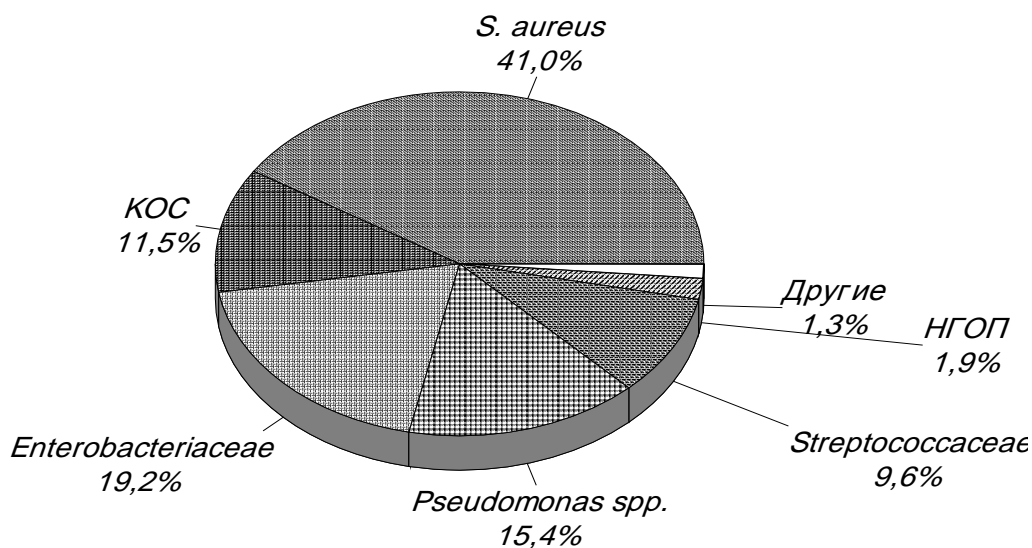


Рисунок 11.16 – Спектр микробной флоры у пациентов с флегмонами

Стафилококки были представлены *S.aureus* – 64 изолята (41%) и КОС – 18 (11,5%). КОС были идентифицированы как *S.epidermidis* – 8 изолятов (5,1%), *S.chromogenes*, *S.equorum*, *S.haemolyticus*, *S.lentus* – по 2 (1,3%). *S.simulans*, *S.xylosus* выделялись по одному изоляту (0,7%).

Энтеробактерии были представлены *E.coli* – 15 изолятов (9,6%), *P.vulgaris* – 6 (3,8%), *P.mirabilis* – 1 (0,7%), *M. morganii* 1 (0,7%), *E.cloacae* – 4 (2,6%), *K.ornithinolytica* – 2 (1,3%), *K.pneumoniae* – 1 (0,7%). Из представителей рода *Pseudomonas* идентифицированы *P.aeruginosa* – 23 изолята (14,7%) и *P.cepacia* – 1 (0,7%).

Семейство *Streptococcaceae* было представлено *S.pyogenes* – 11 изолятов (7%) и по 1 изоляту *S.oralis*, *S.anginosus*, *S.constellatus*, *Enterococcus avium* (0,7%).

НГОП были идентифицированы как *A. hydrophila*, *A.sobria* и *Plesiomonas shigelloides*.

В 52,6% случаев (82 изолята) выделялся только один вид бактерий, а в 47,4% (74 изолята) микробные ассоциации (табл. 11.14), которые характеризовались большим разнообразием. Вероятность формирования биопленок ассоциациями бактерий представлена по данным собственных исследований.

Таблица 11.14 – Ассоциации микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с флегмонами

Ассоциация	Количество	Вероятность формирования БП
<i>S.aureus</i> + <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	8	90-100%
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	6	50-80%
<i>S.aureus</i> + <i>S.pyogenes</i>	3	50-70%
<i>Staphylococcus</i> spp. + НГОП	2	50-80%
KOC + <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	2	90-100%
KOC + <i>Pseudomonas</i> spp.	2	50-80%
KOC + <i>Enterobacteriaceae</i> spp. + <i>P.aeruginosa</i>	2	90-100%
<i>E.coli</i> + <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	2	90-100%
<i>P.aeruginosa</i> + <i>Streptococcus</i> spp.	2	50-80%
<i>S.aureus</i> + <i>E.coli</i> + <i>E.cloacae</i>	1	90-100%
<i>S.aureus</i> + <i>E.avium</i>	1	50-70%
<i>S.epidermidis</i> + <i>S.pyogenes</i>	1	50-70%
<i>P.aeruginosa</i> + <i>E.coli</i>	1	90-100%
<i>P.aeruginosa</i> + <i>Micrococcus roseus</i>	1	50-80%
<i>E.coli</i> + <i>P.aeruginosa</i> + <i>S.pyogenes</i>	1	90-100%
Всего	35	

Наиболее часто выявляемой ассоциацией у пациентов с флегмонами было сочетание *S.aureus* с представителем энтеробактерий (22,9%).

Изоляты *S.aureus* оказались наименее резистентны к офлоксацину (0%), цефазолину (0%), цефотаксиму (0%), норфлоксацину (0%), рифампицину (0%), меропенему (2,5%), имипенему (2,9%), ципрофлоксацину (2,9%), цефалотину (3,5%), ванкомицину (6%), пефлоксацину (6,7%), амикацину (14,3%), гентамицину (15,8%), нетромицину (16,1%), ампициллину+сульбактаму (20%), клиндамицину (22,8%), доксициклину (25%), амоксициллину+клавуланату (25,9%), канамицину (30%), ко-тримоксазолу (30%), эритромицину (31,6%), оксациллину – 33,3% резистентных изолятов. Более высокий уровень устойчивости был продемонстрирован к линкомицину (43,3%), тетрациклину (43,5%), хлорамфениколу – 57,1% устойчивых изолятов. Наибольшая резистентность изолятов *S.aureus* выявлена к пенициллину (93,3%), азитромицину – 100% резистентных изолятов (рис. 11.17).

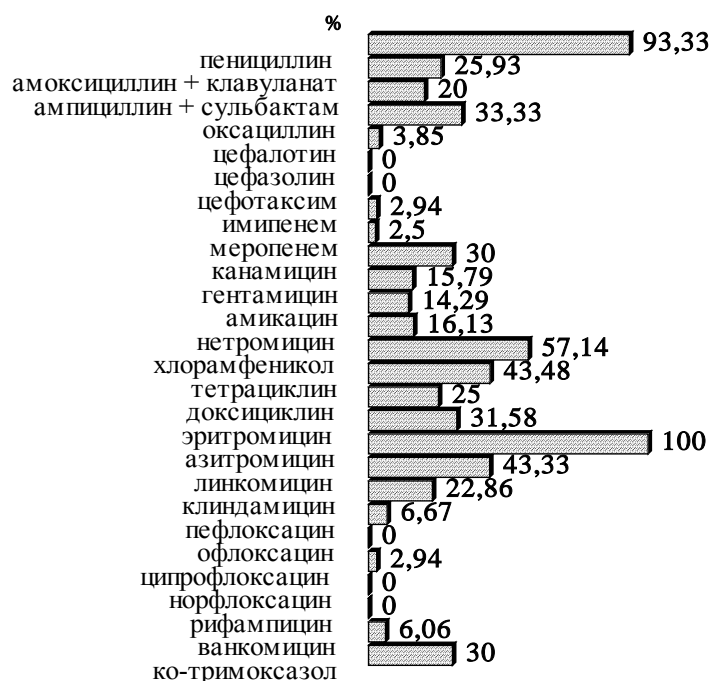


Рисунок 11.17 – Резистентность *S.aureus* к антибиотикам у пациентов с флегмонами

КОС оказались наименее устойчивы к меропенему (0%), имипенему (0%), ванкомицину (9%), норфлоксацину (25%), амикацину (28,6%), нетромицину (30%), офлоксацину (30%), цiproфлоксацину (33,3%), рифампицину (40%), амоксициллину+клавуланату (40%), пефлоксацину (44,4%), цефалотину (44,4%), клиндамицину – 45,5% устойчивых изолятов.

Более высокий уровень резистентности был выявлен к оксациллину (50%), гентамицину (50%), ко-тримоксазолу (50%), канамицину (55,6%), ампициллину+сульбактаму (55,56%), линкомицину (61,5%), хлорамфениколу (70%), эритромицину (77,8%), тетрациклину (80%), пенициллину – 100% резистентных изолятов (рис. 11.18).

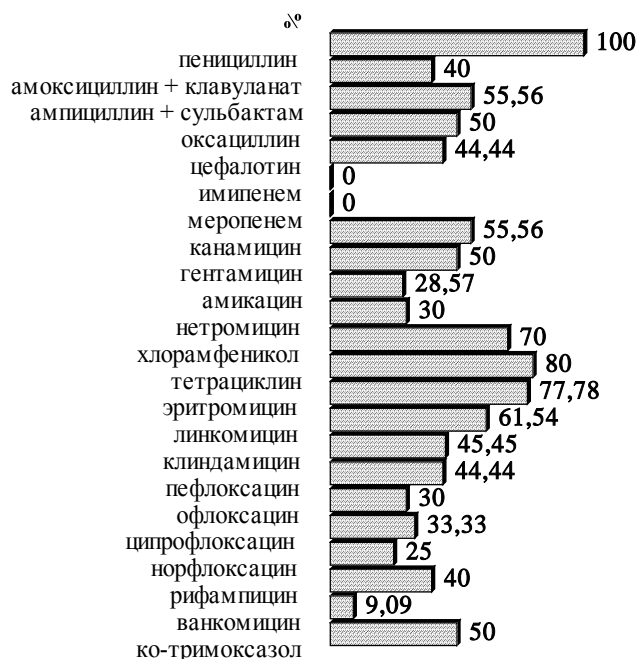


Рисунок 11.18 – Резистентность КОС к антибиотикам у пациентов с флегмонами

По сравнению с *S.aureus* КОС были достоверно более резистентны к цефалотину, рифампицину, пефлоксацину, тетрациклину, эритромицину ( $p < 0,05$ ) [374].

Изоляты энтеробактерий продемонстрировали наименьшую устойчивость к имипенему (0%), цiproфлоксацину (4,2%), офлоксацину (13%), пефлоксацину (13%), амикацину (16%), азтреонаму (17,4%), цефокситину (33,3%), цефтазидиму – 34,8% резистентных изолятов. Более высокий уровень резистентности был выявлен к цефотаксиму (44,4%), нетромицину (48%), гентамицину (50%), канамицину (52,2%), пиперациллину (57,2%), ко-тримоксазолу (60%), цефуросиму (60,9%), мециллинаму – 66, 7% устойчивых изолятов. Высокая степень резистентности была выявлена к хлорамфениколу (78,3%), тикарциллину (78,3%), тетрациклину (79,2%), цефалотину (82,6%), амоксициллину+клавуланату (88%), амоксициллину – 96% резистентных изолятов (рис. 11.19).

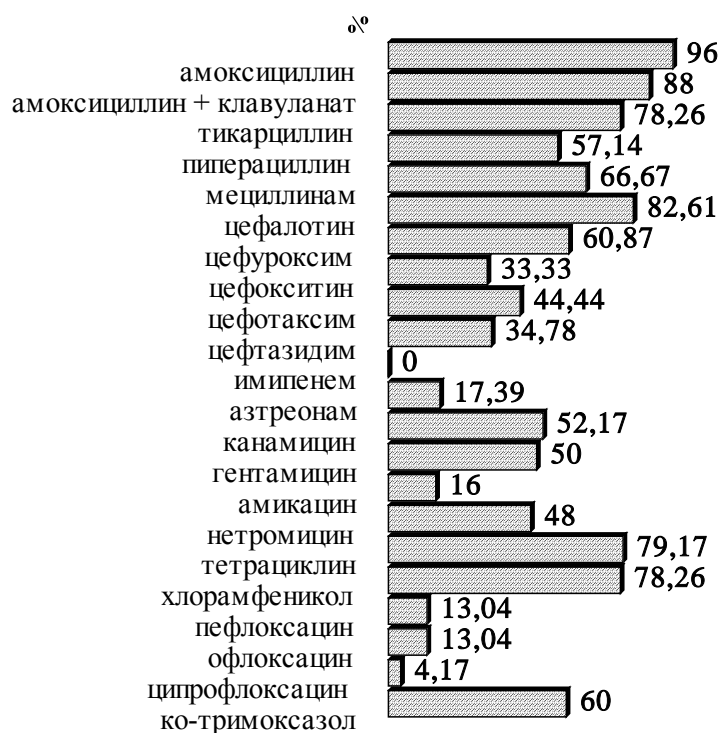


Рисунок 11.19 – Резистентность энтеробактерий к антибиотикам у пациентов с флегмонами

Изоляты псевдомонад были наименее резистентны к имипенему (16,67%), амикацину (25%), ципрофлоксацину – 25% устойчивых изолятов. Высокий уровень резистентности выявлен к азтреонаму (62,5%), пиперациллину (66,7%), нетромицину (75%), цефтазидиму (78,3%), тикарциллину (83,3%), пепфлоксацину (83,3%), гентамицину (87%), ко-тримоксазолу (92%), офлоксацину – 93% устойчивых изолятов (рис.11.20).

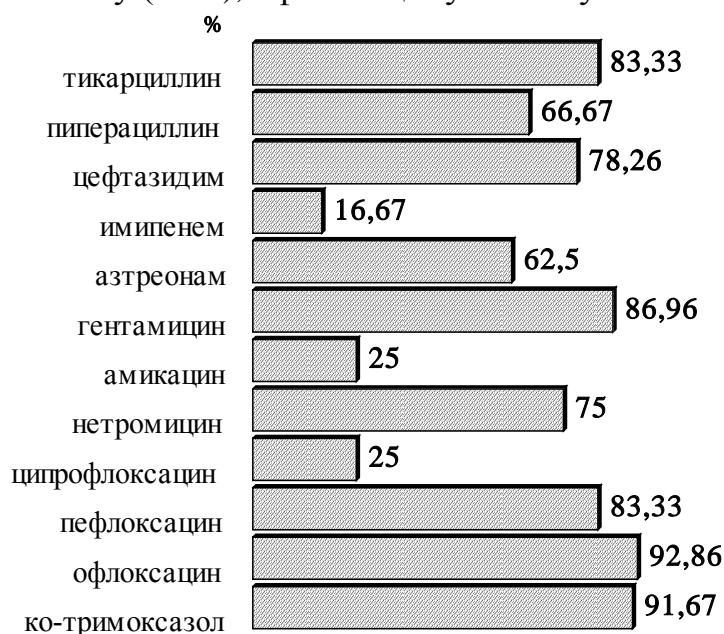


Рисунок 11.20 – Резистентность псевдомонад к антибиотикам у пациентов с флегмонами

Представители семейства *Streptococcaceae* продемонстрировали низкую степень устойчивости к гентамицину (0%), рифампицину (0%), цефалотину (6,7%), стрептомицину (6,7%), канамицину (6,7%), ампициллину (13,3%), цефуросиму (13,3%), пенициллину (20%), ко-тримоксазолу (21,4%), ванкомицину (26,7%), эритромицину (33,3%), линкомицину (33,3%), оксациллину – 40% резистентных изолятов. Высокая резистентность определена к тетрациклину – 73,3% устойчивых изолятов (рис. 11.21).

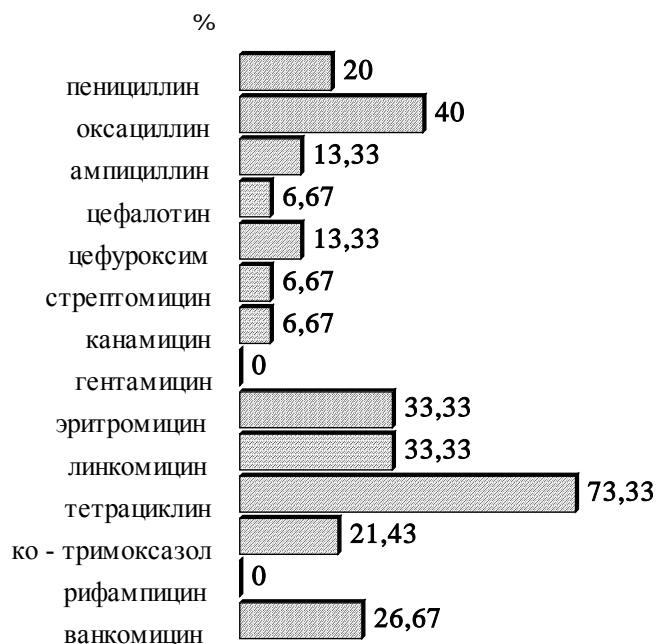


Рисунок 11.21 – Резистентность стрептококков к антибиотикам у пациентов с флегмонами

На основании данных об этиологической структуре и резистентности микрофлоры к антибиотикам разработана схема рациональной эмпирической антибиотикотерапии флегмон (табл. 11.15).

Таблица 11.15 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с флегмонами с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>Staphylococcus spp.</i>	цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин); ампициллин+сульбактам, цефотаксим	ванкомицин; фторхинолоны; карбапенемы	тигециклин, ципрофлоксацин
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	амикацин; цефтазидим; цефокситин	фторхинолоны; карбапенемы	тигециклин
<i>Pseudomonadaceae spp.</i>	амикацин	ципрофлоксацин; карбапенемы	колистин



Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>S.aureus</i> + <i>Enterobacteriaceae</i> <i>spp.</i>	амикацин + цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин) или цефтазидим	фторхинолон + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин); амикацин + цефотаксим или ванкомицин; карбапенемы	тигециклин, ципрофлоксацин
состав микрофлоры не известен	амикацин + цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин)	фторхинолон + цефазолин или цефалотин; амикацин + цефотаксим или ванкомицин; карбапенемы	тигециклин, ципрофлоксацин
имеются клинические признаки анаэробной инфекции	амикацин + цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол	фторхинолон + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол или клиндамицин	фторхинолоны 4 поколения + тигециклин

У пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной одного клетчаточного пространства, выделено 20 изолятов стрептококков (36%), 27 изолятов стафилококков (48%), 4 изолята бацилл (7%), 2 изолята *A. sobria* (4%), 3 изолята *P. aeruginosa* (5%).

Стрептококки у пациентов с данной патологией идентифицированы как *Streptococcus spp.* (15%),  $\beta$ -гемолитический стрептококк (25%),  $\alpha$ -гемолитический стрептококк (15%), негемолитический стрептококк (5%). Также идентифицированы *S. acidominimus* (10%), *S. pyogenes* (10%), *S. mutans* (10%), *S. anginosus* (5%). В 5% случаев идентифицирован *A. viridans*. Гемолитические стрептококки составили 40% среди возбудителей стрептококков острого одонтогенного остеомиелита челюсти, осложненного флегмоной одного клетчаточного пространства.

Среди стафилококков-возбудителей острого одонтогенного остеомиелита челюсти, осложненного флегмоной одного клетчаточного пространства, выделены *S. aureus* (11,1%) и КОС (88,9%), которые идентифицированы как *Staphylococcus spp.* (7,4%), *S. epidermidis* (25,9%), *S. chromogenes* (14,8%), *S. hominis* (11,1%), *S. xylosus* (11,1%), *S. capitis* (7,4%), *S. sciuri* (3,7%), *S. equorum* (3,7%), *S. simulans* (3,7%).

Бациллы были идентифицированы как *Bacillus spp.*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. lecheniformis* – по 1 изоляту (рис.11.22).

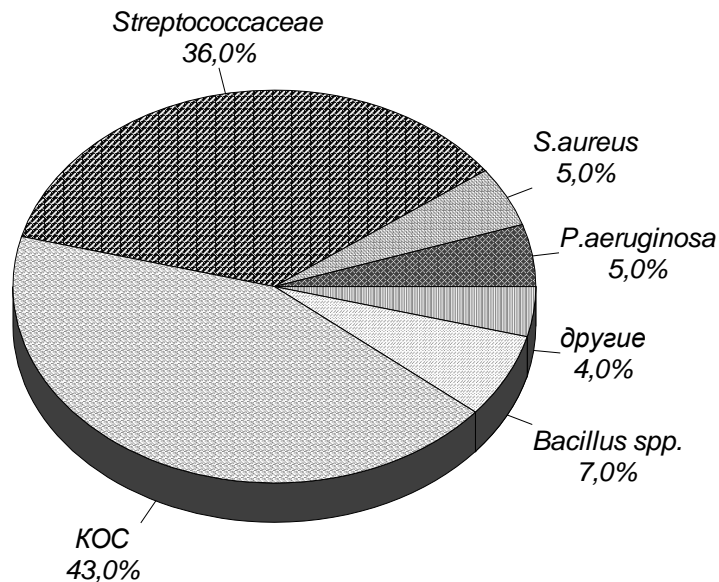


Рисунок 11.22 – Спектр микробной флоры у пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной одного клетчаточного пространства

У пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной двух и более клетчаточных пространств, выделено 19 изолятов стрептококков (47,5%), 20 изолятов стафилококков (50%), 1 изолят *A. sobria* (2,5%).

При этом стрептококки идентифицированы как  $\beta$ -гемолитический стрептококк (21,05%),  $\alpha$ -гемолитический стрептококк (10,5%), негемолитический стрептококк (5,26%). С помощью тест-систем определены *S. haemolyticus* (10,52%), *S. adjacents* (5,2%), *S. anginosus* (5,2%), *S. mutans* (5,2%). Кроме этого идентифицированы *Leuconostoc spp.* (10,5%), *A. viridans* (5,2%), *E. faecalis* (5,2%).

У пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной двух и более клетчаточных пространств (рис.11.23), среди возбудителей-стафилококков идентифицированы *S. aureus* (15%) и КОС (85%), среди которых *Staphylococcus spp.* (10%), *S. epidermidis* (30%), *S. hominis* (25%), *S. sciuri* (10%), *S. equorum* (10%).

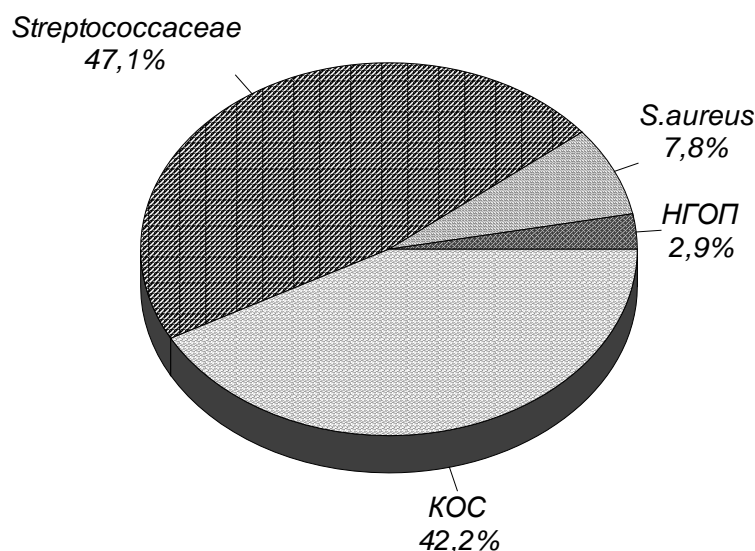


Рисунок 11.23 – Спектр микробной флоры у пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной нескольких клетчаточных пространств

При развитии флегмон одонтогенной этиологии ведущую роль играют КОС и стрептококки, тогда как флегмоны других локализаций вызваны в основном золотистым стафилококком. У пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной одного клетчаточного пространства, наименьший уровень антибиотикорезистентности стрептококков (рис. 11.24) выявлен к рифампицину (0%), тейкопланину (16,6%), ко-тримаксозолу (22,2%), нитрофурантоину (22,2%), ампициллину (25,3%), линкомицину (27,7%), ванкомицину (27,7%), цефалотину (27,7%), цефуроксиму (33,3%). Более высокий уровень резистентности выявлен к эритромицину (44,4%), пенициллину (45,5%), тетрациклину (55,5%), оксациллину (57,9%), гентамицину (83,4%), стрептомицину (100%), канамицину (100%).

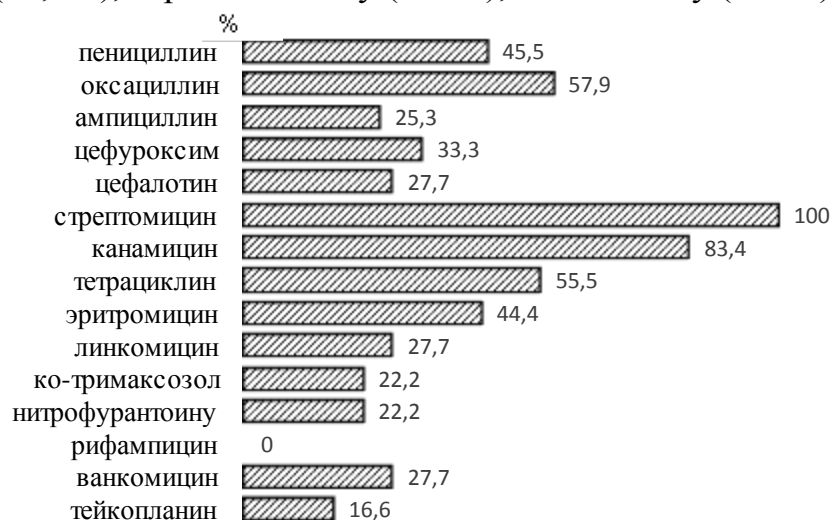


Рисунок 11.24 – Резистентность стрептококков к антибиотикам у пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной одного клетчаточного пространства

При остром одонтогенном остеомиелите челюсти, осложненном флегмоной одного клетчаточного пространства, выявлено 41% изолятов *MRSA*. Стафилококки при данной патологии продемонстрировали следующую резистентность к антибиотикам: к ванкомицину – 0%, к цефалотину – 0%, к цефазолину – 0%, к нетилмицину – 0%, к норфлоксацину – 0%, к пристионамицину – 0%, к амикацину – 6,6%, к ампициллину+сульбактаму – 7%, к ципрофлоксацину – 7%, к пefлоксацину – 7,7%, к цефепиму – 12,5%, к амоксициллину+клавуланату – 14,3%, к офлоксацину – 18%, к рифампицину – 18%, к канамицину – 18,6%, к цефотаксиму – 20%, к новобиоцину – 20%, к гентамицину – 20,1%, к тобромицину – 22%, к клиндамицину – 27%, к нитрофурантоину – 28,5%, к тейкопланину – 28,6%, к линкомицину – 28,6%, к ко-тримаксозолу – 33,3%, к меропенему – 37,5%, к эритромицину – 40%, к тетрациклину – 42%, к доксициклину – 50%, к миноциклину – 50%, к хлорамфениколу – 53%, к фосфомицину – 66,6%, к имипенему – 75%, к пенициллину – 93,3%, к азитромицину – 100% (рис. 11.25).

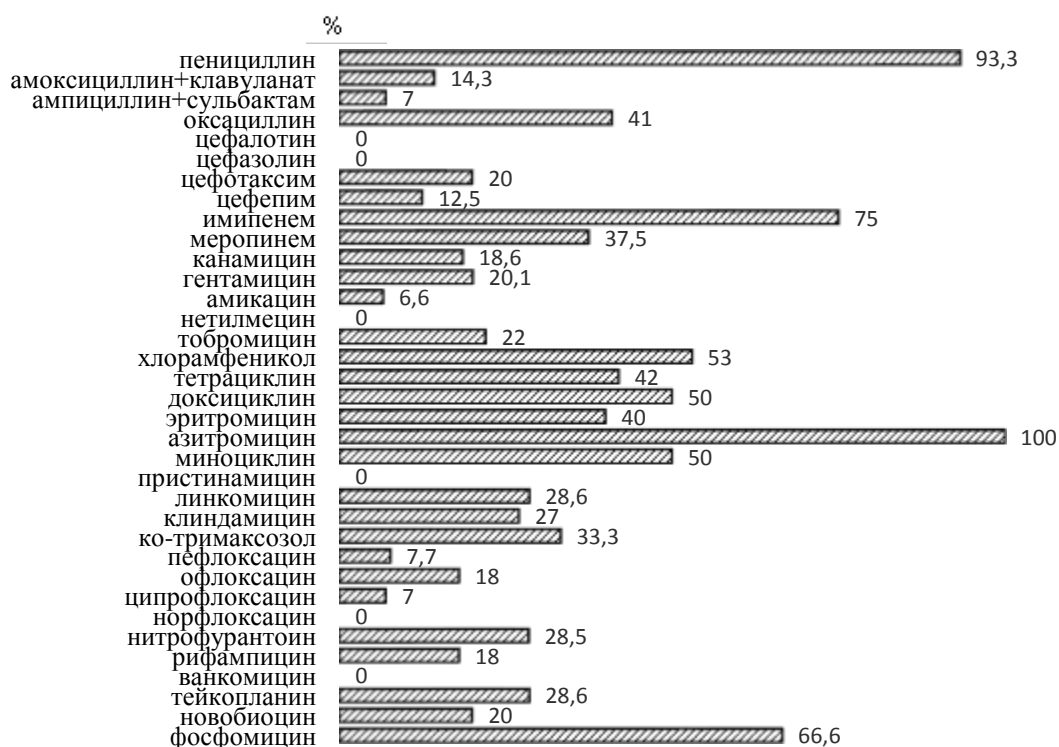


Рисунок 11.25 – Резистентность стафилококков к антибиотикам у пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной одного клетчаточного пространства

На основании данных об этиологической структуре и резистентности микрофлоры к антибиотикам разработана схема рациональной эмпирической антибиотикотерапии острого одонтогенного остеомиелита челюсти, осложненного флегмоной одного клетчаточного пространства (табл. 11.16), с учетом способности возбудителя формировать БП.

Таблица 11.16 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной одного клетчаточного пространства, с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>MSSA</i>	цефалотин, цефазолин, амоксациллин+ клавуланат	цефепим, ванкомицин	тигекцилин, ципрофлоксацин
<i>MRSA</i>	ванкомицин	линезолид	тигекцилин, ципрофлоксацин
<i>Streptococcus spp.</i>	ампициллин, цефалотин	ванкомицин	тигекцилин
состав микрофлоры не известен	цефалотин, амоксациллин+ клавуланат	ванкомицин, амикацин+ цефазолин	тигекцилин

При остром одонтогенном остеомиелите челюсти, осложненном флегмоной нескольких клетчаточных пространств, у стрептококков выявлена высокая резистентность (рис. 11.26) к стрептомицину (91,6%) и канамицину (91,6%), гентамицину (79,5%), оксациллину (77%); средняя степень устойчивости к антибиотикам выявлена к пенициллину (61,5%), ампициллину (53,8%), тетрациклину (58,3%), нитрофурантоину (46,2%), цефуроксиму (46,2%), эритромицину (41,6%), линкомицину (38,5%), ванкомицину (38,5 %), ко-тримаксозолу (35,7%). Наименьшая резистентность стрептококков при данной патологии выявлена к цефалотину (26,6%) и рифампицину (21,4%).

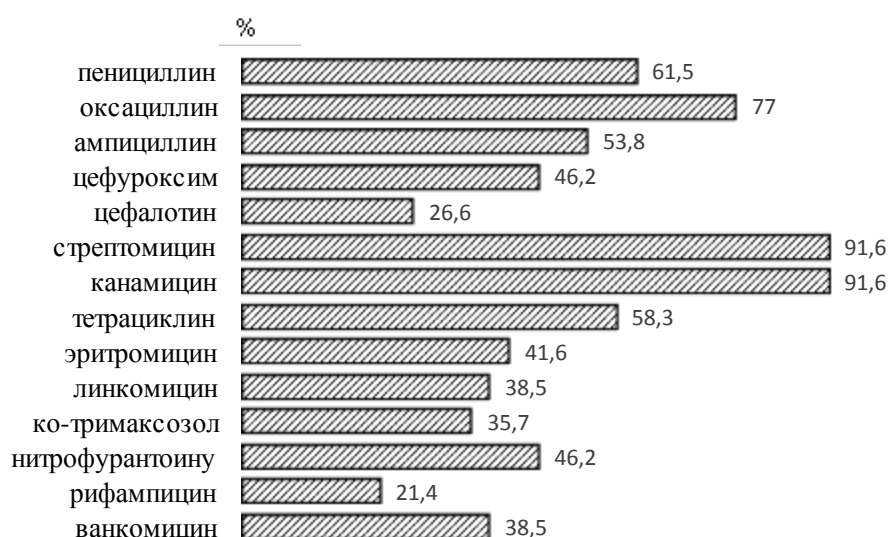


Рисунок 11.26 – Резистентность стрептококков к антибиотикам у пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной нескольких клетчаточных пространств

При остром одонтогенном остеомиелите челюсти, осложненном флегмоной нескольких клетчаточных пространств, выявлено 35,7% метициллин-резистентных изолятов стафилококков. У пациентов с данной патологией, стафилококки продемонстрировали следующие показатели резистентности к антибиотикам: к ванкомицину – 0%, нетромицину – 0%, цефотаксиму – 0%, новобиоцину – 0%, цефепиму – 0%, фосфомицину – 0%, цефазолину – 0%, норфлоксацину – 0%, пристинамицину – 0%, офлоксацину – 8,4%, цефалотину – 9,1%, клиндамицину – 15,4%, амикацину – 20 %, пефлоксацину – 20% гентамицину – 22,2%, амоксициллину+клавуланату – 22,2%, ципрофлоксацину – 22,4%, тобромицину – 25%, нетилмицину – 25%, нитрофурантоину – 25%, ванкомицину – 27,2%, ампициллину+сульбактаму – 30%, рифампицину – 30,7%, канамицину – 40%, линкомицину – 41%, меропенему – 50%, миноциклину – 50%, эритромицину – 55,5%, ко-тримаксозолу – 55,5%, доксициклину – 57%, тейкопланину – 66,6%, хлорамфениколу – 75 %, тетрациклину – 75%, имипенему – 100%, пенициллину – 100 %, азитромицину – 100% (рис. 11.27).

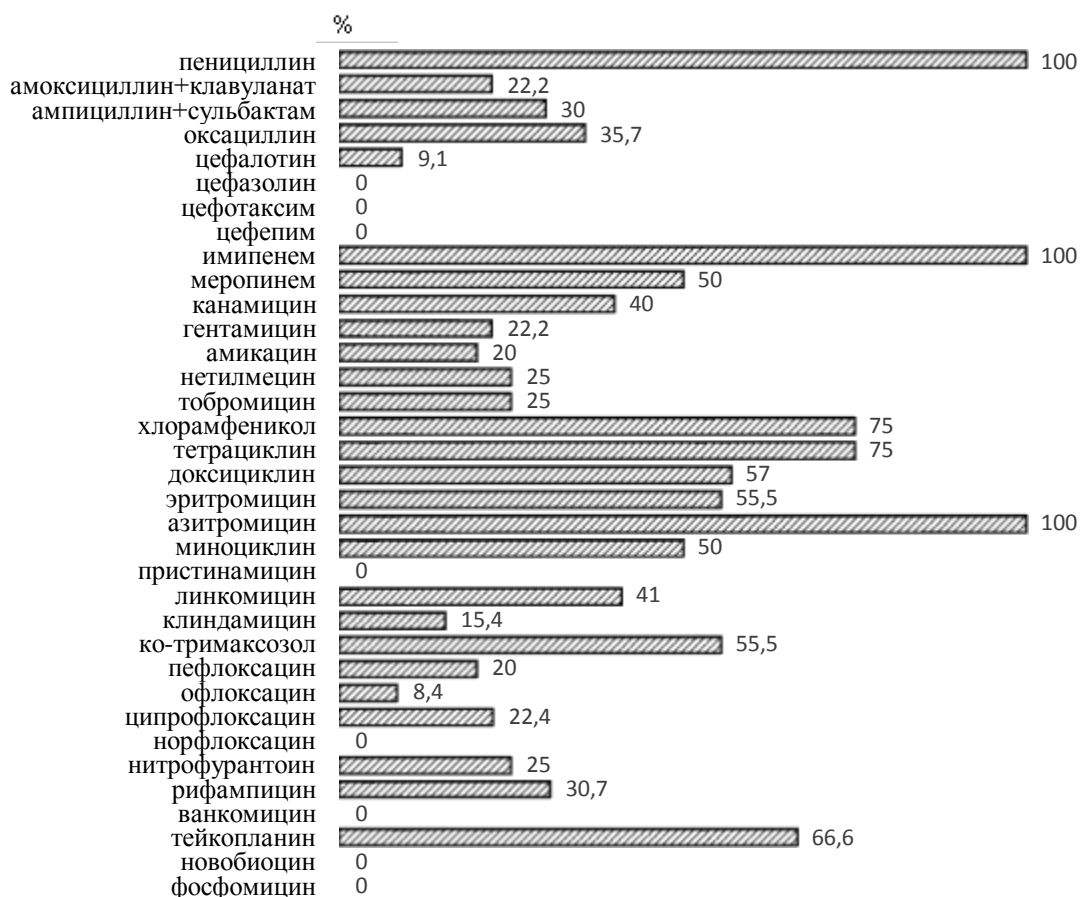


Рисунок 11.27 – Резистентность стафилококков к антибиотикам у пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной нескольких клетчаточных пространств

На основании данных об этиологической структуре и резистентности микрофлоры к антибиотикам разработана схема рациональной

эмпирической антибиотикотерапии острого одонтогенного остеомиелита челюсти, осложненного флегмоной нескольких клетчаточных пространств (табл. 11.17), с учетом способности возбудителя формировать БП.

Таблица 11.17 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с острым одонтогенным остеомиелитом челюсти, осложненным флегмоной нескольких клетчаточных пространств, с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>MSSA</i>	цефалотин, цефазолин, амоксиклав+ клавуланат	цефепим, ванкомицин	норфлоксацин, ципрофлоксацин, тигекцилин
<i>MRSA</i>	ванкомицин	линезолид	тигекцилин, ципрофлоксацин
<i>Streptococcus spp.</i>	цефалотин	ванкомицин	тигекцилин
Состав микрофлоры не известен	цефалоспорины 1 поколения+ фторхинолоны	ванкомицин+ цефалоспорины	тигекцилин

### 11.7 Гематогенный остеомиелит

От 42 пациентов с гематогенным остеомиелитом выделен 41 (43,16%) микроорганизм представитель рода *Staphylococcus*, 23 изолята (24,21%) семейства *Enterobacteriaceae*, 22 изолята (23,16%) семейства *Pseudomonadaceae*, 7 изолятов НГОП (7,37%) и по одному изоляту *S.pyogenes* и *E.faecalis* (1,05%). Отрицательные результаты первичных посевов получены при исследовании микрофлоры в 13 случаях. Спектр микробной флоры при гематогенном остеомиелите представлен на рисунке 11.28.

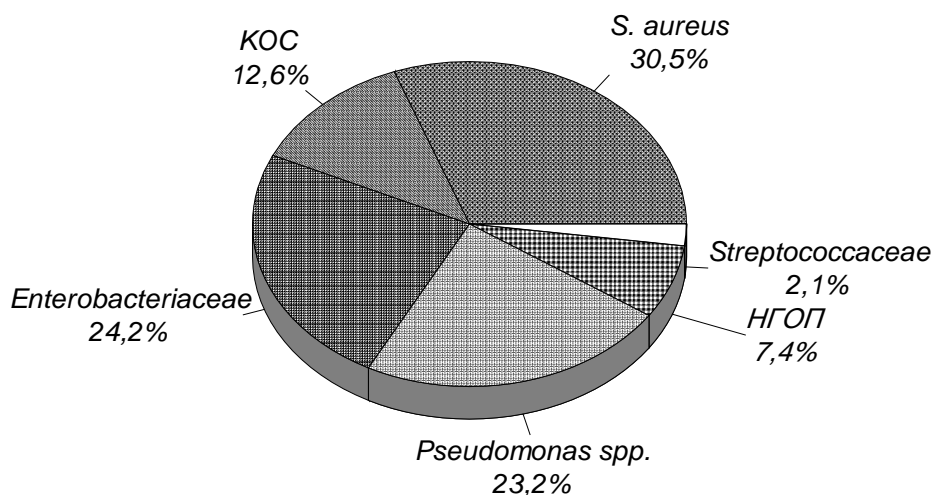


Рисунок 11.28 – Спектр микробной флоры у пациентов с гематогенным остеомиелитом

Стафилококки были идентифицированы как *S.aureus* – 29 изолятов (30,5%) и КОС – 12 (12,6%). Последние были представлены *S.capitis* – 3 изолята (3,2%), *S.epidermidis*, *S.hominis* – по 2 (2%). *S.intermedius*, *S.lentus*, *S.sciuri*, *S.warneri*, *S.xylosus* выделялись по одному изоляту (1%).

Энтеробактерии были представлены *P.mirabilis* – 10 изолятов (10,5%), *P.vulgaris* – 2 (2,1%), *E.coli* – 3 (3,2%), *K.pneumoniae* – 3 (3,2%), *K.oxytoca* – 1 (1%), *K.planticola* – 1 (1%), *E.aerogenes* – 2 (2%) и *P. rettgeri* – 1 изолят (1%).

Из представителей семейства *Pseudomonadaceae* выделены *P.aeruginosa* – 20 изолятов (21%) и *P.putida* – 2 (2,1%). НГОП были представлены *A. baumannii* – 5 изолятов (5,3%) и по одному изоляту *A. sobria* и *Agrobacter radiobacter* (1%). В 66% случаев (63 изолята) выделялся только один вид бактерий, а в 33,7% (32 изолята) микробные ассоциации (табл. 11.18).

Таблица 11.18 – Ассоциации микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с гематогенным остеомиелитом

Ассоциация	Количество	Вероятность формирования БП
<i>P.aeruginosa</i> + <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	6	90-100%
<i>Staphylococcus spp.</i> + <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	3	90-100%
<i>Staphylococcus spp.</i> + <i>P.aeruginosa</i>	3	50-80%
<i>Staphylococcus spp.</i> + НГОП	2	50-80%
<i>S.aureus</i> + <i>S.pyogenes</i>	1	50-70%
<i>S.aureus</i> + <i>S.intermedius</i>	1	50-70%
<i>K.pneumoniae</i> + <i>P.mirabilis</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1	90-100%
Всего	17	-

Сочетание *P.aeruginosa* и энтеробактерий было наиболее часто встречающейся микробной ассоциацией (35,3%).

Изоляты золотистого стафилококка оказались наименее резистентны к имипенему (0%), меропенему (0%), цефалотину (0%), цефазолину (0%), норфлоксацину (0%), ципрофлоксацину (0%), офлоксацину (5,9%), нетромицину (7,7%), пefлоксацину (8,3%), амикацину (11,1%), рифампицину (11,7%), ванкомицину (13,6%), доксициклину (16,7%), ампициллину+сульбактаму (16,7), цефепиму (20%), цефотаксиму (25%), ко-тримоксазолу (25%), оксациллину (26,1%), клиндамицину (26,7%), гентамицину (33,3%). Более высокий уровень резистентности был выявлен к амоксициллину+клавуланату (38,5%), канамицину (38,5%), линкомицину (47%), тетрациклину (54,6%), эритромицину (61%), хлорамфениколу – 69,2% устойчивых изолятов. Наибольшая устойчивость *S.aureus* выявлена к пенициллину и азитромицину – 100% устойчивых изолятов (рис. 11.29).



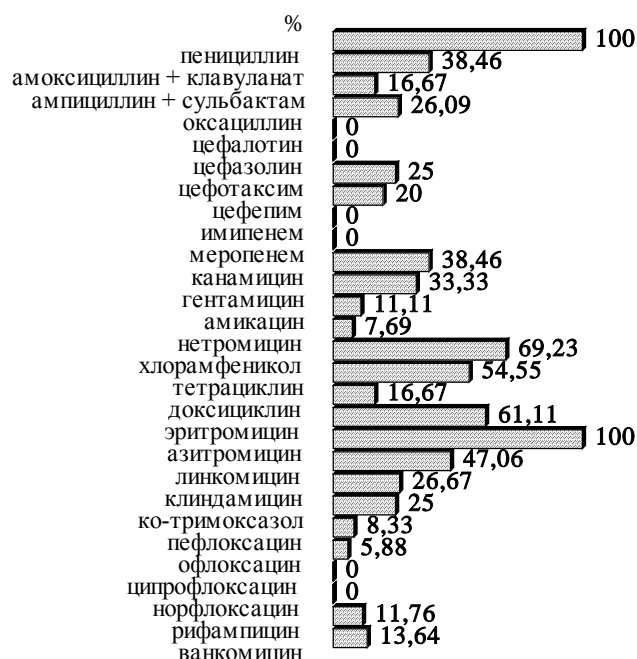


Рисунок 11.29 – Резистентность *S.aureus* к антибиотикам у пациентов с гематогенным остеомиелитом

КОС оказались наименее устойчивы к цефалотину (0%), имипенему (0%), меропенему (0%), норфлоксацину (0%), амикацину (12,5%), канамицину (20%), ципрофлоксацину (28,6%), ванкомицину (28,6%), хлорамфениколу (33,3%), рифампицину (33,3%), нетромицину (40%), ампициллину+сульбактаму (40%), амоксициллину+клавуланату (40%), пифлоксацину (40%), оффлоксацину (42,9%), клиндамицину – 42,9% устойчивых изолятов. Более высокий уровень резистентности был выявлен к гентамицину (44,4%), ко-тримоксазолу (50%), оксациллину (50%), доксициклину (66,7%), эритромицину (70%), линкомицину (71,4%), пенициллину – 83,3% устойчивых изолятов (рис. 11.30).

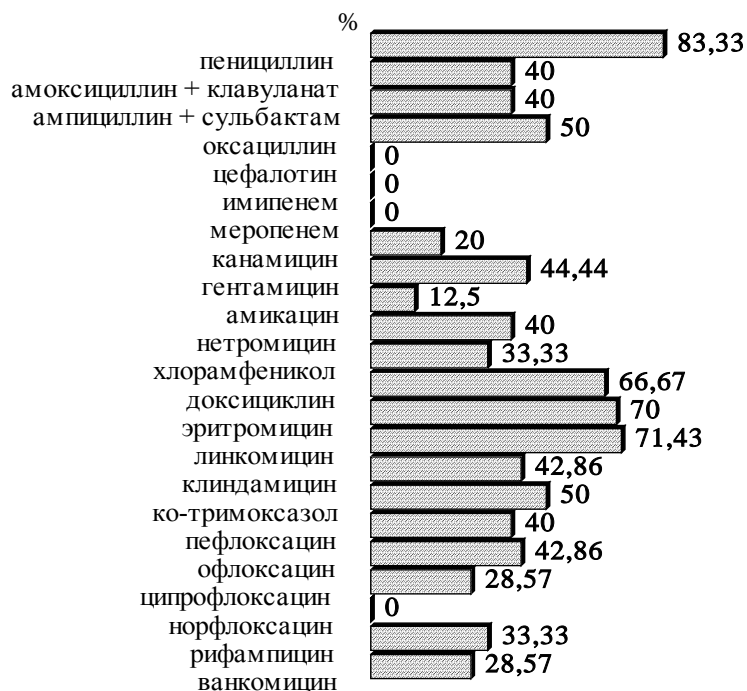


Рисунок 11.30 – Резистентность КОС к антибиотикам у пациентов с гематогенным остеомиелитом

Изоляты энтеробактерий показали наименьшую резистентность к имипенему (0%), амикацину (23,5%), цефокситину – 25% резистентных изолятов. Более высокий уровень устойчивости был продемонстрирован к азтреонаму (53,3%), ципрофлоксацину (53,3%), офлоксацину (56,2%), цефтазидиму (57,1%), пепфлоксацину (71,4%), канамицину (72,7%), нетромицину (75%), цефотаксиму – 75% устойчивых изолятов. Высокая степень резистентности была выявлена к хлорамфениколу (78,57%), цефалотину (81,2%), гентамицину (82,3%), пиперациллину (83,3%), амоксициллину+клавуланату(86,6%), ко-тримоксазолу (87,5%), мециллину (90,9%), цефуроксиму (91,6%), тикарциллину (92,8%), тетрациклину (100%), амоксициллину – 100% резистентных изолятов.

Изоляты псевдомонад оказались наименее резистентны к имипенему (19%), амикацину (21,7%), ципрофлоксацину (41,2%), азтреонаму – 66,7% устойчивых изолятов. К остальным антибактериальным препаратам выявлена высокая степень устойчивости: цефтазидим (83,3%), пиперациллин (85,7%), гентамицин (86,4%), тикарциллин (88, 9%), нетромицин (91,3%), офлоксацин (92,3%), ко-тримоксазол (95,2%), пепфлоксацин – 100% устойчивых изолятов. Устойчивость энтеробактерий и псевдомонад к антибиотикам представлена на рисунке 11.31.

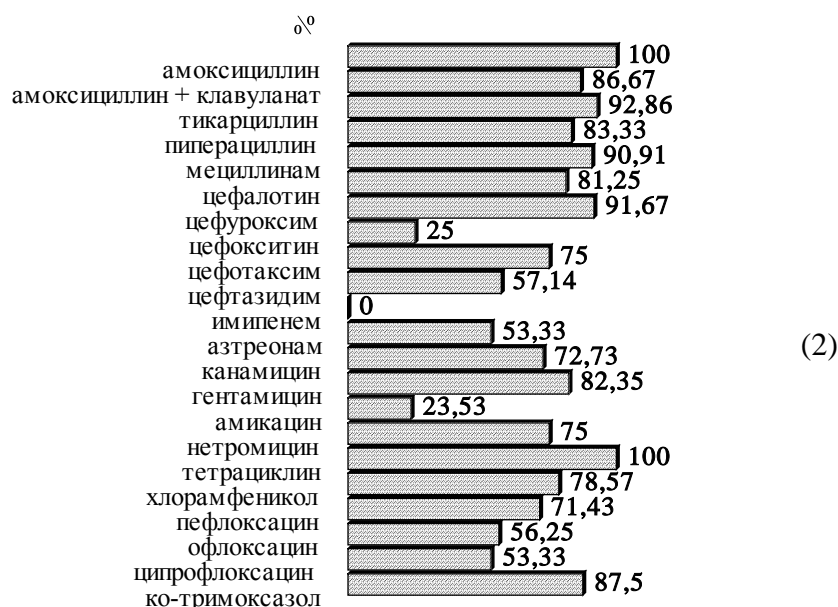
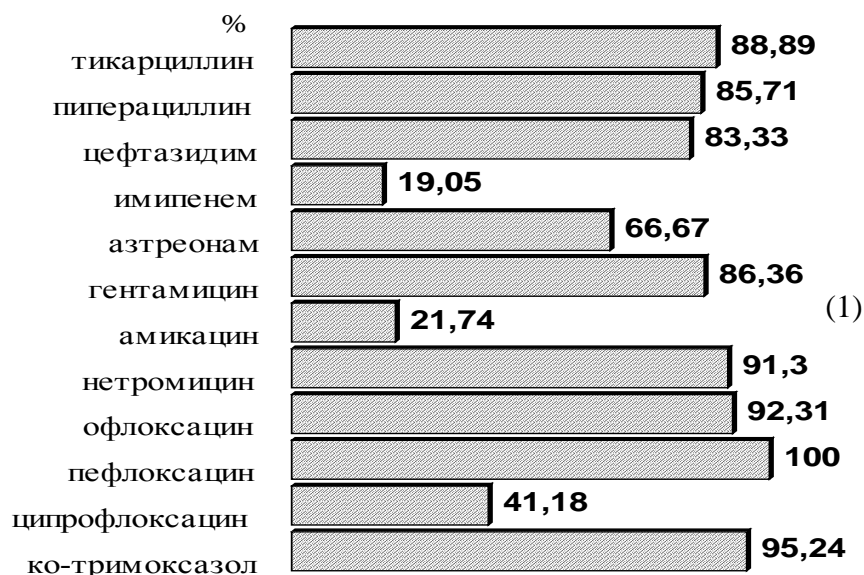


Рисунок 11.31 – Резистентность к антибиотикам энтеробактерий (1) и псевдомонад (2) у пациентов с гематогенным остеомиелитом

Изоляты НГОП продемонстрировали наименьшую устойчивость к имипенему (0%), цефотаксиму (25%), гентамицину (25%), ципрофлоксацину – 25% резистентных изолятов. Более высокий уровень резистентности выявлен к амоксициллину, амоксициллину+клавуланат, тикарциллину, цефокситину, цефуроксиму, канамицину, амикацину, нетромицину, тетрациклину, пефлоксацину, офлоксацину, ко-тримоксазолу – 33,3% устойчивых изолятов; цефалотину (50%), хлорамфениколу (50%). Высокая степень устойчивости определена к азтреонаму, мециллинаму, цефтазидиму – 100% резистентных изолятов (рис. 11.32).

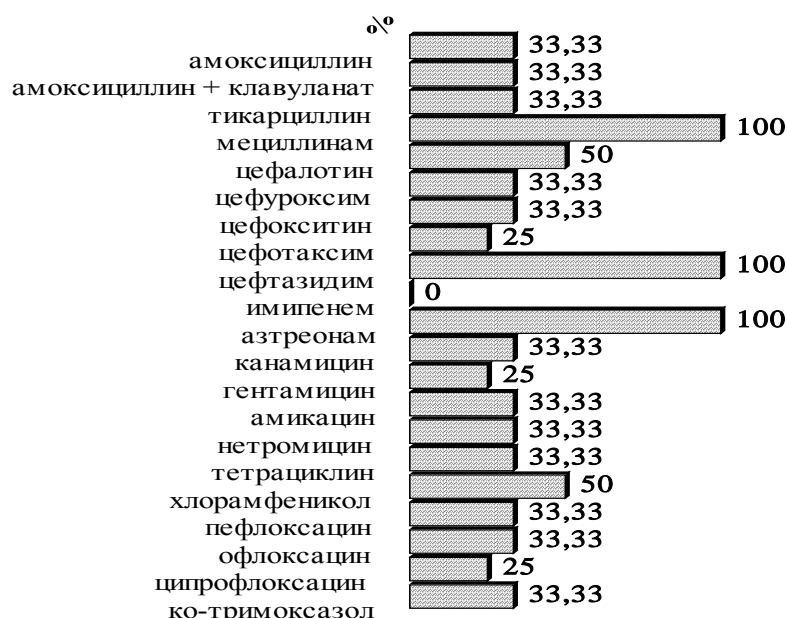


Рисунок 11.32 – Резистентность НГОП к антибиотикам у пациентов с гематогенным остеомиелитом

На основании данных об этиологической структуре возбудителей гематогенного остеомиелита и их антибиотикорезистентности разработан протокол эмпирической антибиотикотерапии данной патологии [375].

Схема эмпирической антибиотикотерапии гематогенного остеомиелита представлена в таблице 11.19.

Таблица 11.19 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с гематогенным остеомиелитом с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>Staphylococcus spp.</i>	цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин); ампициллин+сульбактам; амоксициллин+клавуланат	фторхинолоны, карбапенемы	тигециклин, ципрофлоксацин
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	амикацин; цефокситин; цефтазидим	фторхинолоны; карбапенемы;	тигециклин
<i>Pseudomonadaceae spp.</i>	амикацин	ципрофлоксацин; карбапенемы	колистин
<i>P.aeruginosa + Enterobacteriaceae spp.</i>	амикацин + цефокситин	ципрофлоксацин + цефтазидим; карбапенемы	тигециклин + колистин

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
состав микрофлоры не известен	амикацин + цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин)	карбапенемы	ципрофлоксацин

### 11.8 Инфекция трофических язв

От 75 пациентов с трофическими язвами идентифицировано 68 (46,9%) микроорганизмов представителей рода *Staphylococcus*, 42 изолята (28,9%) семейства *Pseudomonadaceae*, 28 изолятов (19,3%) семейства *Enterobacteriaceae*, 3 изолята (2,07%) представителя рода *Streptococcus*, 2 изолята (1,4%) НГОП и по одному изоляту *G. haemolysans* и *Micrococcus lylae* (0,7%). Отрицательные результаты первичных посевов получены в 6 случаях. Спектр микробной флоры у пациентов с инфекцией трофических язв представлен на рисунке 11.33.

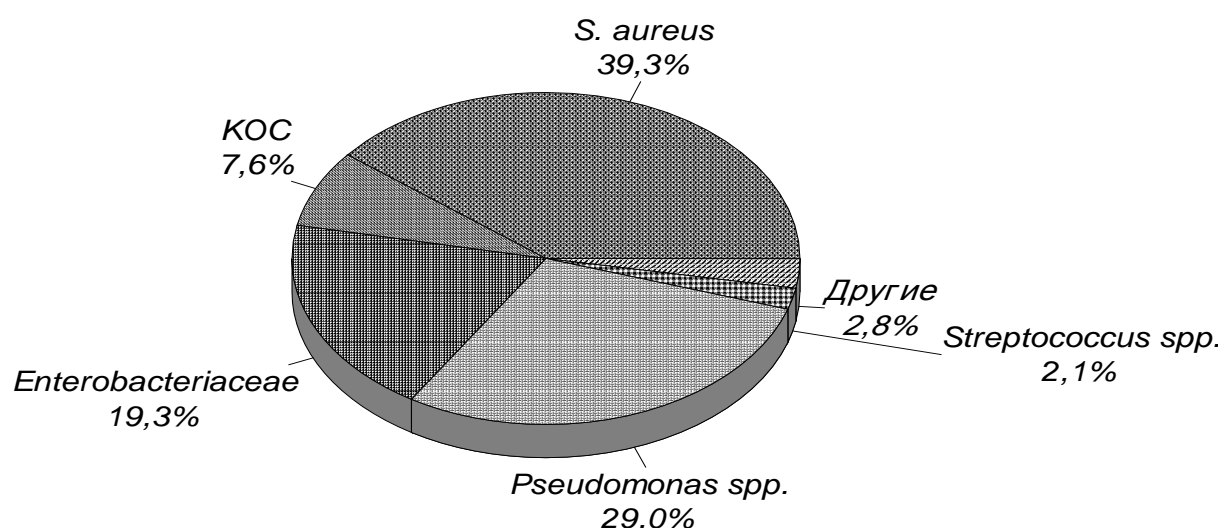


Рисунок 11.33 – Спектр микробной флоры у пациентов с инфекцией трофических язв

Стафилококки были представлены *S.aureus* – 57 изолятов (39,3%) и КОС – 11 (7,6%). Последние были идентифицированы как *S.capitis* 2 изолята (1,48%), *S.xylosus* – 2 (1,4%). *S.haemolyticus*, *S.sciuri*, *S.epidermidis*, *S.chromogenes*, *S.lentus*, *S.equorum*, *S.simulans* выделялись по одному изоляту (0,7%).

Среди представителей семейства *Pseudomonadaceae* идентифицированы: *P.aeruginosa* – 39 изолятов (26,9%), *P.putida* – 2 (1,4%), *P.fluorescens* – 1 (0,7%).

Энтеробактерии были идентифицированы как *E.cloacae* – 10 (6,9%), *E.agglomerans* – 1 (0,7%), *E.amnigenus* – 1 (0,7%), *P.mirabilis* – 6 изолятов (4,1%), *P.vulgaris* – 2 (1,4%), *E.coli* – 4 (2,7%), *K.ornithinolytica* – 3 (2,07%), *C.freundii* – 1 (0,7%).

Род *Streptococcus* был представлен *S.pyogenes* – 3 изолята. НГОП идентифицированы как *A.baumannii* и *Agrobacter radiobacter* 1 (0,7%).

В 28,3% случаев (41 изолят) выделен один вид бактерий, а в 71,7% (104 изолята) обнаружены ассоциации микроорганизмов, что представлено в таблице 11.20 с учетом вероятности формирования БП.

Таблица 11.20 – Ассоциации микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с инфекцией трофических язв

Ассоциация	Количество	Вероятность формирования БП
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	15	100%
<i>S.aureus</i> + <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	11	90-100%
KOC+ <i>P.aeruginosa</i>	6	50-80%
<i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Enterobacteriaceae</i> spp. + <i>Pseudomonas</i> spp.	5	90-100%
<i>S.aureus</i> + 2 вида <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	3	90-100%
<i>P.aeruginosa</i> + <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	2	90-100%
<i>S.aureus</i> + НГОП	1	50-70%
<i>A. baumannii</i> + <i>S.lentus</i>	1	90-100%
<i>S.aureus</i> + <i>G. haemolysans</i>	1	50-70%
<i>P.fluorescens</i> + <i>M. lylae</i>	1	50-70%
<i>P.mirabilis</i> + <i>S.pyogenes</i>	1	90-100%
<i>S.xylosum</i> + <i>E.amnigenus</i>	1	50-70%
Всего	48	-

Наиболее часто встречающейся микробной ассоциацией у пациентов с трофическими язвами было сочетание синегнойной палочки и золотистого стафилококка (31,2%).

Изоляты *S.aureus* оказались наименее резистентны к меропенему (2,5%), имипенему (3,23%), цефотаксиму (0%), цефалотину (0%), цефазолину (7,69%), рифампицину (8,3%), норфлоксацину (9,1%), ванкомицину (9,1%), офлоксацину (10,5%), ципрофлоксацину (15,4%), нетромицину (16,7%), пефлоксацину (17,6%), оксациллину (26,5%), амикацину (29%), тобрамицину (30%), клиндамицину – 30% резистентных изолятов. Более высокий уровень резистентности был выявлен к гентамицину (37,04%), ко-тримоксазолу (37,5%), ампициллину+сульбактаму (38, 9%), амоксициллину+клавуланату (41,2%), канамицину (43,7%), линкомицину (50%), доксициклину (50%), эритромицину – 52,2% устойчивых изолятов. Наибольший уровень устойчивости изоляты золотистого стафилококка продемонстрировали к тетрациклину (70%), хлорамфениколу (83,3%), пенициллину (86,9%), азитромицину – 100% резистентных изолятов (рис. 11.34).

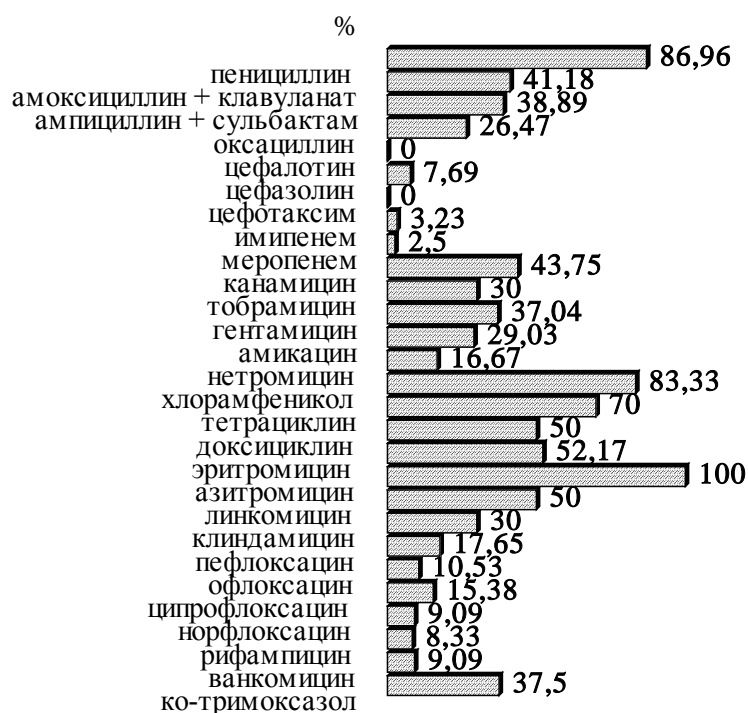


Рисунок 11.34 – Резистентность *S.aureus* к антибиотикам у пациентов с инфекцией трофических язв

КОС продемонстрировали наименьшую резистентность к имипенему (0%), меропенему (0%), ципрофлоксацину (22,22%), ванкомицину (25%), нетромицину (25%), амикацину (28,5%), офлоксацину (28,6%), ампициллину+сульбактаму (42,8%), амоксициллину+клавуланату (42,8%), гентамицину (42,8%), норфлоксацину (42,8%), пепфлоксацину – 42,8% устойчивых изолятов. Более высокий уровень резистентности был определен к цефалотину (50%), рифампицину (66,6%), канамицину (71,43%), оксациллину (85,7%), клиндамицину (87,5%), хлорамфениколу (87,5%), эритромицину (87,5%), тетрациклину (100%), пенициллину (100%), ко-тримоксазолу (100%), линкомицину – 100% устойчивых изолятов (рис. 11.35).

КОС продемонстрировали более высокий уровень устойчивости почти ко всем антимикробным препаратам, по сравнению с золотистым стафилококком изоляты оказались достоверно более резистентны к цефалотину, эритромицину, клиндамицину, рифампицину, оксациллину, линкомицину, ко-тримоксазолу ( $p < 0,05$ ).

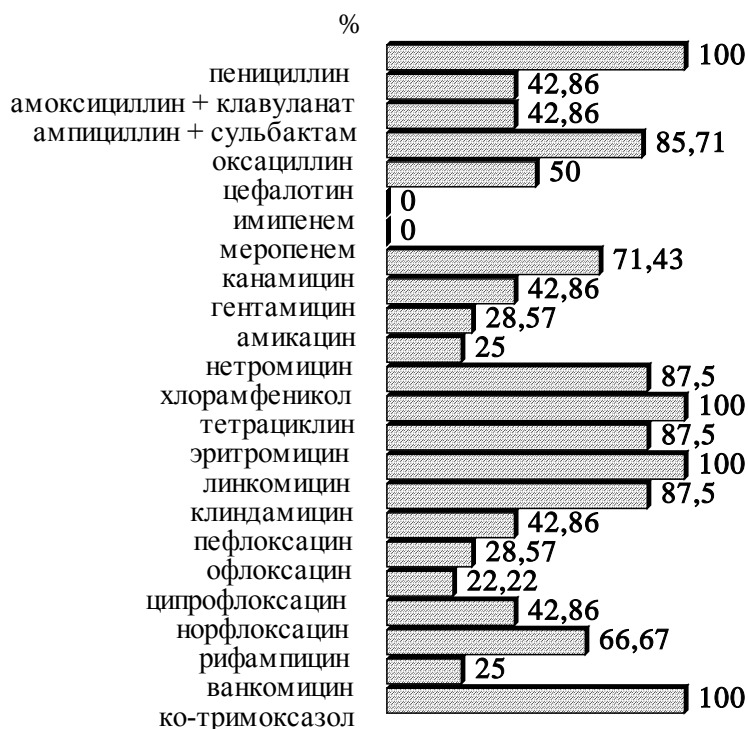


Рисунок 11.35 – Резистентность КОС к антибиотикам у пациентов с инфекцией трофических язв

В отношении энтеробактерий наибольшей эффективностью обладали имипенем (0%), ципрофлоксацин (12%), офлоксацин (16,67%), амикацин (17,8%), цефепим (20%), пекфлоксацин (22,7%), тобрамицин (23,8%), гентамицин (25,9%), нетромицин (25,9%), цефотаксим (28%), азтреонам (33,3%), канамицин (45,5%), цефтазидим – 45,4% устойчивых изолятов.

Более высокий уровень резистентности был продемонстрирован к цефокситину (52,6%), цефуросиму (54,5%), ко-тримоксазолу – 61,5% устойчивых изолятов. Наиболее устойчивыми изоляты энтеробактерий оказались к амоксициллину (80%), амоксициллину+клавуланату (80%), цефалотину (85,7%), мециллинаму (89,4%), хлорамфениколу (90,9%), тетрациклину (95,5%). В то же время к цефазолину, ампициллину+сульбактаму, эритромицину, азитромицину, линкомицину, клиндамицину, доксициклину выявлена 100% устойчивость (рис. 11.36).



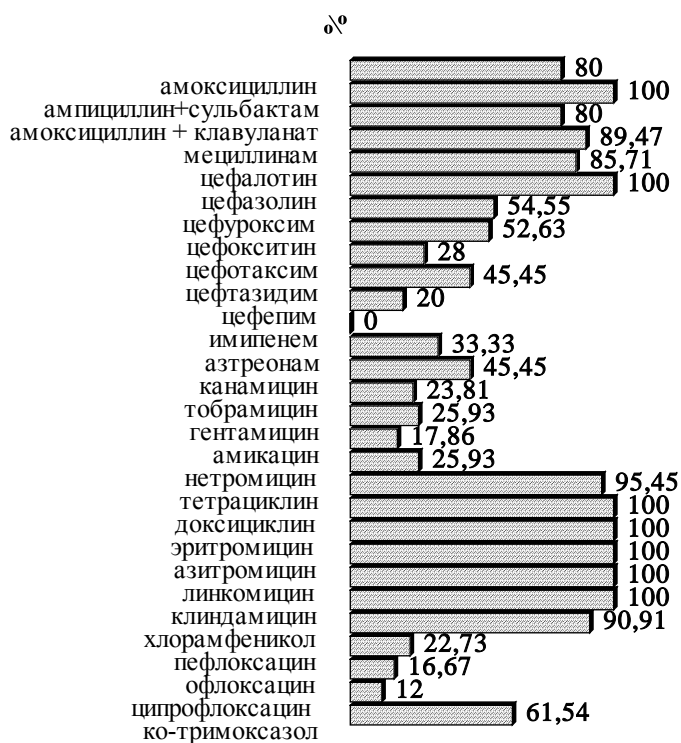


Рисунок 11.36 – Резистентность энтеробактерий к антибиотикам у пациентов с инфекцией трофических язв

Изоляты псевдомонад оказались наименее резистентны к имипенему (10,7%), цефепиму (14,3%), амикацину (25%), ципрофлоксацину (34,4%), пиперациллину (44,4%), тобрамицину (54,8%), пиперациллину+тазобактам – 60% устойчивых изолятов. Высокая устойчивость наблюдалась к гентамицину (72,5%), нетромицину (73,7%), азтреонаму (76,7%), офлоксацину (80%), тикарциллину (80,65%), цефтазидиму (83,33%), ко-тримоксазолу (89,4%), пепфлоксацину (96,7%), цефоперазону (100%), карбенициллину – 100% устойчивых изолятов (рис. 11.37).

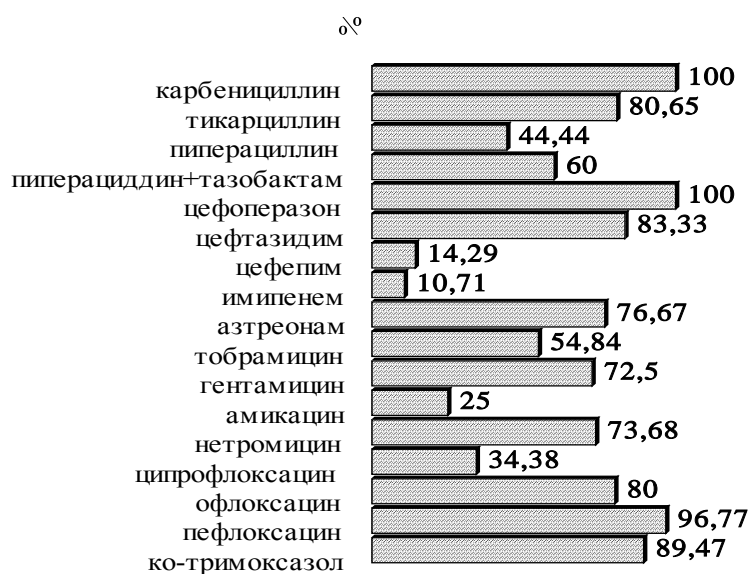


Рисунок 11.37 – Резистентность псевдомонад к антибиотикам у пациентов с инфекцией трофических язв

Высокую активность против стрептококков показали ампициллин, цефуроксим, цефалотин, эритромицин и ванкомицин – 0% устойчивых изолятов. Схема рациональной эмпирической антибиотикотерапии инфекции трофических язв с учетом способности возбудителя формировать БП представлена в таблице 11.21.

Таблица 11.21 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с инфекцией трофических язв с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>Staphylococcus spp.</i>	цефалоспорины 1 поколения (цефалотин, цефазолин); цефотаксим; ампициллин+сульбактам; амоксициллин+клавуланат	ванкомицин; фторхинолоны	тигециклин, цiproфлоксацин
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	цефотаксим; аминогликозиды (гентамицин, амикацин, нетромицин)	фторхинолоны; карбапенемы	тигециклин
<i>Pseudomonadaceae spp.</i>	амикацин	ципрофлоксацин, цефепим	колистин
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефалотин, цефазолин)	ципрофлоксацин + цефепим + ванкомицин	тигециклин + колистин
состав микрофлоры не известен	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин)	фторхинолон + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин); ванкомицин + цефепим	ципрофлоксацин + тигециклин

### 11.9 Основные возбудители послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений (нагноений ран, лигатурных свищей и абсцессов), их резистентность к антибактериальным препаратам

От 50 пациентов с послеоперационными гнойно-воспалительными осложнениями выделено 27 (43,5%) микроорганизмов представителя рода *Staphylococcus*, 20 изолятов (32,2%) семейства *Enterobacteriaceae*, 7 изолятов (11,3%) семейства *P.aeruginosa*, 5 изолятов (8,06%) НГОП (исключая псевдомонады), 3 изолята (4,8%) представителей рода *Streptococcus*. Отрицательные результаты первичных посевов получены в 14 случаях, из них в 93% на фоне проводимой антибиотикотерапии [356].

Спектр микроорганизмов-возбудителей у пациентов с послеоперационными гнойно-воспалительными осложнениями представлен на рисунке 11.38.

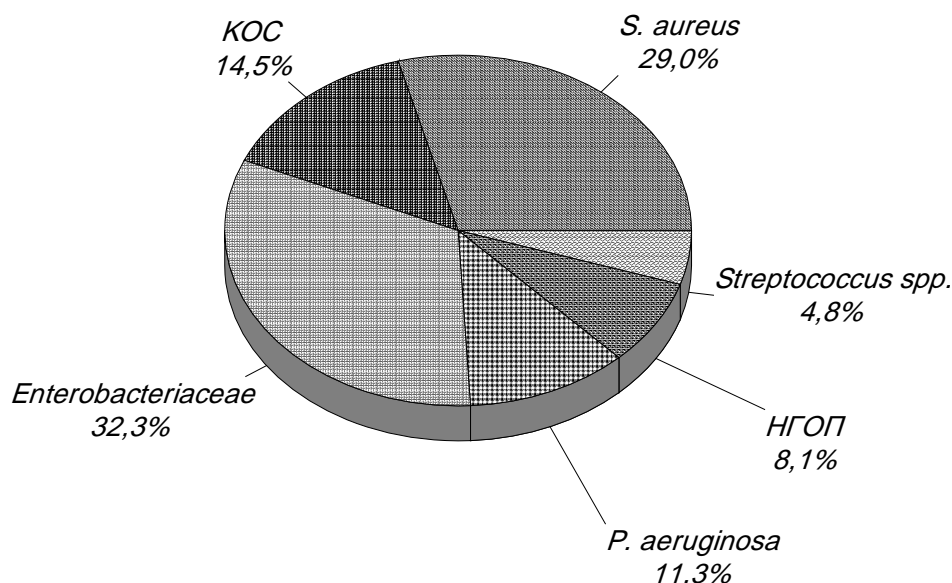


Рисунок 11.38 – Спектр микробной флоры у пациентов с послеоперационными гнойно-воспалительными осложнениями

Стафилококки были представлены *S.aureus* – 18 изолятов (29%) и КОС – 9 (14,5%). Последние были идентифицированы как *S.epidermidis* – 5 (8%), *S.capitis* – 2 изолята (3,23%) и по одному изоляту *S.lentus* и *S.warneri* (1,61%). Энтеробактерии были идентифицированы как *E.coli* – 12 (19%), *E.cloacae* – 3 (4,8%), по два изолята *C. freundii* и *P.mirabilis* (3%) и один изолят *K.pneumoniae* (1,6%). НГОП были представлены *A. baumannii* – 4 изолята (6,4%) и *A. sobria* – 1 изолят (1,6%). Представители рода *Streptococcus* идентифицированы как *S.pyogenes* – 2 (6,2%) и *S.constellatus* – 1 изолят (0,9%). В 64,52% случаев (40 изолятов) выделялся только один вид бактерий, а в 35,4% (22 изолята) микробные ассоциации (табл. 11.22).

Таблица 11.22 – Частота ассоциаций микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с послеоперационными гнойно-воспалительными осложнениями

Ассоциация	Количество	Вероятность формирования БП
<i>Staphylococcus spp.</i> + <i>A. baumannii</i>	3	80-100%
<i>Staphylococcus spp.</i> + <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	2	80-100%
<i>Streptococcus spp.</i> + <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	2	80-100%
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	2	50-80%
<i>S.aureus</i> + <i>S.capitis</i>	1	50-70%
<i>E.coli</i> + <i>A. sobria</i>	1	80-100%
Всего	11	-

Изоляты стафилококков продемонстрировали наименьшую резистентность к имипенему (0%), меропенему (0%), цефазолину (11,1%), цефалотину (14,3%), ванкомицину (15,8%), рифампицину (17,6%), гентамицину (18,7%), нетромицину (20%), офлоксацину (20%), цiproфлоксацину (25%), доксициклину (28,5%), ампициллину+сульбактаму (30%), тобрамицину, амикацину, пефлоксацину – по 33,33% резистентных изолятов. Более высокий уровень устойчивости был выявлен к ко-тримоксазолу (37,5%), норфлоксацину (37,5%), амоксициллину+клавуланату (40%), клиндамицину (42,1%), эритромицину (47%), оксациллину (50%), канамицину (50%), цефотаксиму (60%), линкомицину – 62,5% устойчивых изолятов. Высокая устойчивость была выявлена к тетрациклину (77,8%), хлорамфениколу (77,8%), пенициллину (100%), азитромицину – 100% устойчивых изолятов (рис. 11.39).

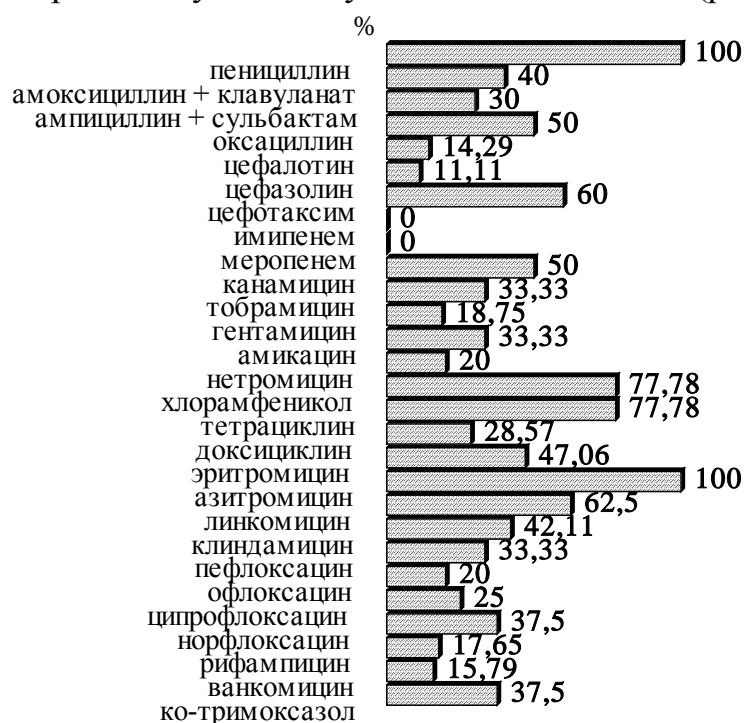


Рисунок 11.39 – Резистентность стафилококков к антибиотикам у пациентов с послеоперационными гнойно-воспалительными осложнениями

Энтеробактерии оказались наименее резистентны к имипенему (0%), цефтазидиму (7,1%), азтреонаму (7,7%), амикацину (11,1%), цефотаксиму (11,76%), нетромицину (20%), пефлоксацину (21,4%), тобрамицину (21,43%), офлоксацину (25%), цефазолину (25%), цефуроскиму (27,3%), тикарциллину+клавуланату (30%), гентамицину (33,33%), цiproфлоксацину (35,7%), цефокситину (36,4%). Более высокий уровень резистентности выявлен к канамицину (45,5%), ко-тримоксазолу (46,7%), тикарциллину (57,1%), мециллинаму (60%), пиперациллину (60%), хлорамфениколу (60%). Высокая резистентность выявлена к амоксициллину (66,7%), цефалотину (69,2%), амоксициллину+клавуланату (73,3%), клиндамицину (75%), тетрациклину – 93,3% (рис. 11.40).

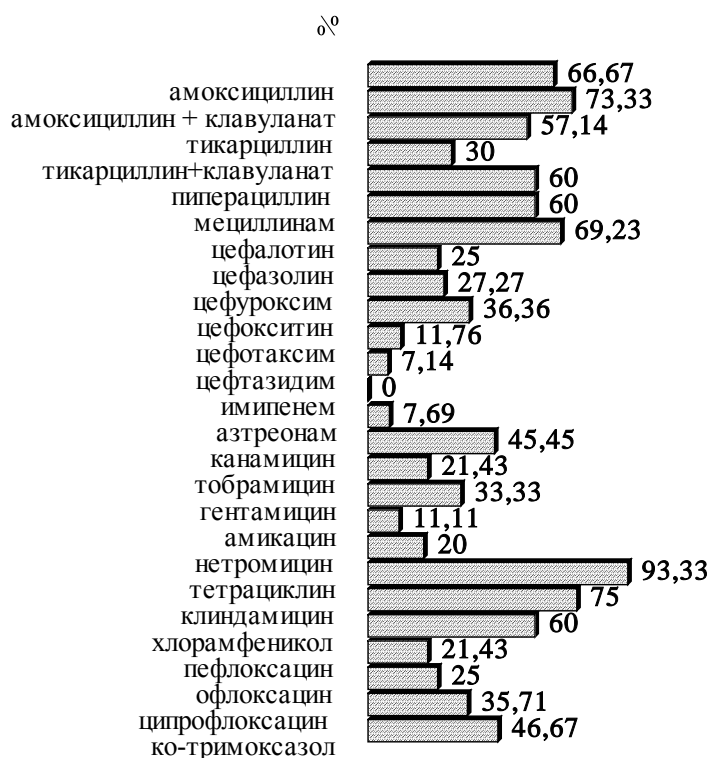


Рисунок 11.40 – Резистентность энтеробактерий к антибиотикам у пациентов с послеоперационными гнойно-воспалительными осложнениями

На основании данных об этиологической структуре и устойчивости микрофлоры к антибиотикам разработана схема рациональной эмпирической антибиотикотерапии пациентов с послеоперационными гнойно-воспалительными осложнениями с учетом способности возбудителя формировать биопленку (табл. 11.23).

Таблица 11.23 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с послеоперационными гнойно-воспалительными осложнениями с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>Staphylococcus spp.</i>	цефалоспорины 1 поколения (цефалотин, цефазолин)	ванкомицин	тигециклин, ципрофлоксацин
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	аминогликозиды (амикацин, нетромицин); цефтазидим; цефотаксим	фторхинолоны, карбапенемы	тигециклин

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
состав микрофлоры не известен или имеются клинические признаки анаэробной инфекции	амикацин + цефалоспорины 1 поколения (цефалотин) + метронидазол	фторхинолоны + метронидазол; карбапенемы	фторхинолоны 4 поколения + тигециклин

### 11.10 Посттравматический остеомиелит

От 100 пациентов с посттравматическим остеомиелитом идентифицировано 113 (51,6%) микроорганизмов представителей рода *Staphylococcus*, 49 изолята (22,37%) семейства *Enterobacteriaceae*, 48 изолятов (21,9%) семейства *Pseudomonadaceae*, 3 изолята НГОП (1,37%), 2 изолята (0,9%) представителя семейства *Streptococcaceae*, 2 изолята *Aerococcus viridans* (0,91%) и по одному изоляту *M. varians* и *M. lylae* (0,5%). Отрицательные результаты посевов получены при исследовании микрофлоры в 13 случаях.

Спектр микробной флоры у пациентов с посттравматическим остеомиелитом представлен на рисунке 11.41.

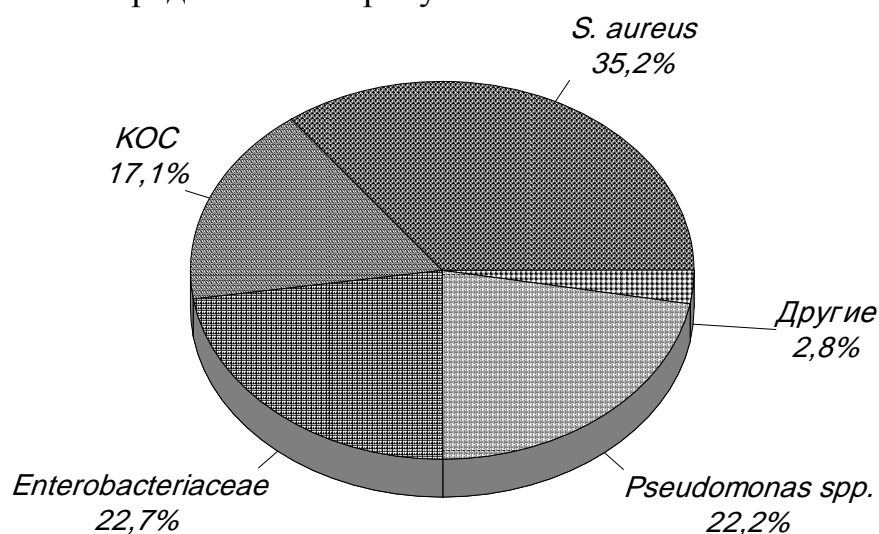


Рисунок 11.41 – Спектр микробной флоры у пациентов с посттравматическим остеомиелитом

Стафилококки были представлены *S. aureus* – 76 изолятов (34,7%) и КОС – 37 (16, 9%). Последние были идентифицированы как *S. capitis* – 10 изолятов (4,5%), *S. epidermidis* – 7 изолятов (3,2%), *S. xylosus* – 5 (2,3%), *S. chromogenes* – 3 (1,37%), *S. simulans*, *S. lentus*, *S. hominis*, *S. cohnii* – по 2 (0,9%). *S. intermedius*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. lugdunensis* выделялись по одному изоляту (0,5%).

Энтеробактерии были идентифицированы как *P. mirabilis* – 11 изолятов (5%), *P. vulgaris* – 2 (0,91%), *E. cloacae* – 5 (2,3%), *E. aerogenes*,

*E.taylorae* – по 1 изоляту (0,5%), *E.coli* – 8 (3,6%), *K.ornithinolytica*, *K.pneumoniae* – по 7 (3,2%), *K.planticola* – 2 (0,9%), *K.oxytoca* – 1 (0,5%), *M.morganii* и *Serratia marcescens* – по 2 изолята (0,9%).

Из представителей семейства *Pseudomonadaceae* выделены: *P.aeruginosa* – 43 изолята (19,6%), *P.putida*, *P.paucimobilis* – по 2 (0,9%), *P.fluorescens* – 1 (0,5%).

Семейство *Streptococcaceae* было представлено *S.dysgalactiae* и *E.faecalis* – по 1 изоляту.

НГОП были представлены *A.baumannii* – 2 изолята (0,9%) и *A.hydrophyla* – 1 (0,5%).

В 54,79% случаев (120 изолятов) выделялся только один вид бактерий, а в 45,2% (99 изолятов) микробные ассоциации (табл. 11.24).

Таблица 11.24 – Ассоциации микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с посттравматическим остеомиелитом

Ассоциация	Количество	Вероятность формирования БП
<i>S.aureus</i> + <i>Pseudomonas</i> spp.	12	50-80%
<i>S.aureus</i> + <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	8	80-100%
КОС + <i>Pseudomonas</i> spp.	9	50-80%
КОС + <i>E.cloacae</i>	3	50-70%
<i>Pseudomonas</i> spp. + <i>Klebsiella</i> spp.	3	80-100%
<i>Staphylococcus</i> spp. + 2 вида <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	2	80-100%
<i>Staphylococcus</i> spp.+ <i>P.aeruginosa</i> + <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	2	80-100%
<i>P.mirabilis</i> + <i>M. varians</i>	1	80-100%
<i>E.coli</i> + <i>A. viridans</i>	1	80-100%
<i>P.mirabilis</i> + <i>M. varians</i>	1	80-100%
<i>S.lugdunensis</i> + <i>P.mirabilis</i>	1	80-100%
<i>A. hydrophyla</i> + <i>S.chromogenes</i>	1	50-70%
<i>S.aureus</i> + <i>S.gallinarum</i> + <i>K.pneumoniae</i>	1	80-100%
<i>S.capitis</i> + <i>E.coli</i> + <i>P.mirabilis</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1	80-100%
Всего	46	-

Наиболее часто встречающейся микробной ассоциацией было сочетание золотистого стафилококка и представителей рода *Pseudomonas*.

Изоляты золотистого стафилококка продемонстрировали наименьшую резистентность к меропенему (2,44%), имипенему (2,9%), офлоксацину (7,5%), цефазолину (8,3%), норфлоксацину (11,1%), ципрофлоксацину (12,2%), цефалотину (12,9%), доксициклину (16,7%), пefлоксацину (18,4%), цефотаксиму (22,2%), рифампицину (24,4%), ванкомицину (26,7%), нетромицину (29,2%), оксациллину (33,3%). Более высокий уровень устойчивости был продемонстрирован к ко-тримоксазолу (37,5%), амикацину (38,6%), гентамицину (40%), ампициллину+сульбактаму (42,5%), амоксициллину+клавуланату (52,6%), клиндамицину (54,7%), канамицину (56,2%), эритромицину (60,9%), хлорамфениколу (66,7%), линкомицину – 69,7% устойчивых изолятов.

Наибольшая устойчивость изолятов *S.aureus* определена к тетрациклину (78,1%), пенициллину (85,7%), азитромицину – 100% резистентных изолятов (рис. 11.42).

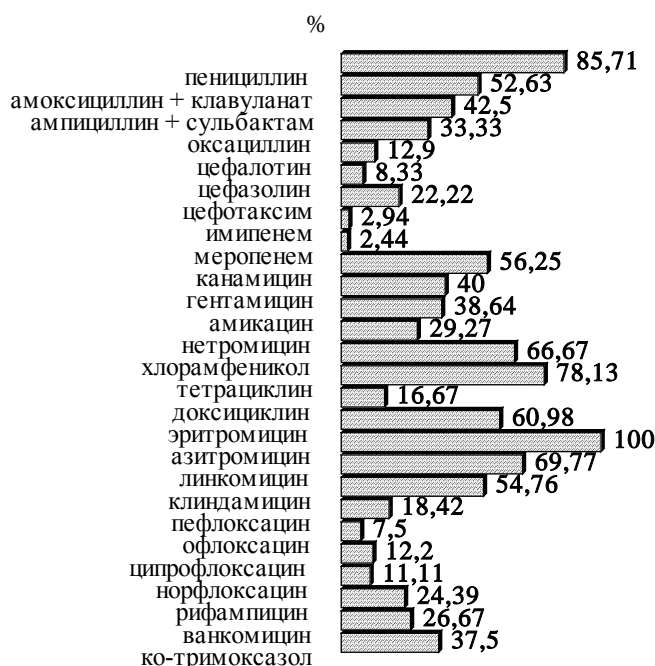


Рисунок 11.42 – Резистентность *S.aureus* к антибиотикам у пациентов с посттравматическим остеомиелитом

КОС оказались наименее резистентны к цефазолину (0%), цефотаксиму (0%), меропенему (0%), имипенему (2,7%), нетромицину (23,08%), ванкомицину (26,92%), офлоксацину (32%), ампициллину+сульбактаму (32%), амоксициллину+клавуланату (36%), цефалотину (36,3%), ципрофлоксацину (38,4%), норфлоксацину (40%), доксициклину (40%), пефлоксацину (42,3%), амикацину (42,3%), гентамицину (48%). Более высокий уровень резистентности обнаружен к ко-тримоксазолу (50%), рифампицину (53,85%), эритромицину (69,2%), клиндамицину (73%), хлорамфениколу (76,2%), оксациллину (77,7%), линкомицину (80,7%), канамицину (85%), пенициллину (96,3%), тетрациклину (100%), азитромицину – 100% резистентных изолятов (рис. 11.43).

По сравнению с *S. aureus* КОС оказались достоверно более резистентны к канамицину, рифампицину, офлоксацину, пефлоксацину, ципрофлоксацину, норфлоксацину ( $p < 0,05$ ), а также к тетрациклину ( $p < 0,01$ ) и оксациллину ( $p < 0,001$ ).



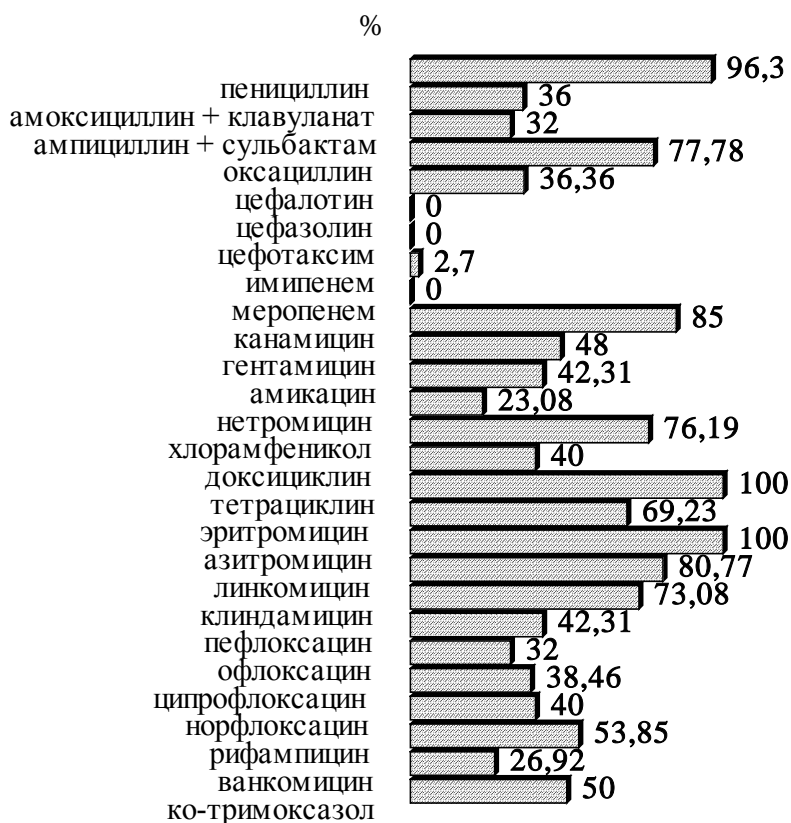


Рисунок 11.43 – Резистентность КОС к антибиотикам у пациентов с посттравматическим остеомиелитом

Изоляты псевдомонад были наименее резистентны (рис. 11.44) к пиперациллину+тазобактаму (0%), амикацину (13,9%), имипенему (16,7%), ципрофлоксацину (28,1%), пиперациллину (40%), азтреонаму (54,8%), тикарциллину (57,1%), гентамицину (58,33%), нетромицину – 61,11% резистентных изолятов. Высокая резистентность выявлена к цефтазидиму (64,71%), ко-тримоксазолу (75%), пекфлоксацину (80%), офлоксацину (88,5%).



Рисунок 11.44 – Резистентность псевдомонад к антибиотикам у пациентов с посттравматическим остеомиелитом

Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с посттравматическим остеомиелитом с учетом способности возбудителей формировать БП представлена в таблице 11.25.

Таблица 11.25 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с посттравматическим остеомиелитом с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>Staphylococcus spp.</i>	цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин); цефотаксим; ампициллин+сульбактам; амоксициллин+клавуланат	ванкомицин; карбапенемы	тигециклин, ципрофлоксацин
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	цефотаксим; аминогликозиды (гентамицин, амикацин, нетромицин)	цефтазидим; фторхинолоны; карбапенемы	тигециклин
<i>Pseudomonadaceae spp.</i>	аминогликозиды (гентамицин, амикацин, нетромицин)	ципрофлоксацин; карбапенемы	колистин
<i>Staphylococcus spp. + Pseudomonas spp.</i>	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефазолин, цефалотин); гентамицин + амоксициллин+клавуланат	ципрофлоксацин + цефалоспорин I поколения (цефазолин, цефалотин); карбапенемы	тигециклин+колистин

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
состав микрофлоры не известен	амикацин + цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол	фторхинолон (ципрофлоксацин) + цефалоспорины 1 поколения (цефазолин, цефалотин) + метронидазол; карбапенемы	ципрофлоксацин + тигециклин

У пациентов с травматическим остеомиелитом челюсти выделено 14 изолятов стрептококков (30%), 27 изолятов стафилококков (56%), 2 изолята бацилл (4%), 3 изолята *A. sobria* (6%), 1 изолят *P. aeruginosa* (2%), 1 изолят *K. pneumonia* (2%).

Стрептококки у пациентов с травматическим остеомиелитом челюсти идентифицированы как  $\alpha$ -гемолитический стрептококк (28,57%),  $\beta$ -гемолитический стрептококк (21,43%), негемолитический стрептококк (7,14%). С помощью тест-систем идентифицированы *S. anginosus* (14,29%), *S. constellatus* (7,14%), *S. oralis* (7,14%), *S. mutans* (7,14%) и рода *Gemella* – *G. morbillorum* (7,14%). Среди стафилококков при травматическом остеомиелите челюсти КОС выделены в 88,9% случаев, среди которых наибольшую долю составил *S. epidermidis* (62,97%), *S. chromogenes* – в 11,11%, *S. hominis* – в 3,7%, *S. sciuri* – в 3,7%, *S. capitis* – в 3,7%, *S. xylosus* – в 3,7%. *S. aureus* идентифицирован в 11,1% случаев.

Бациллы идентифицированы как *Bacillus spp.* и *B. pumilus* (рис.11.45).

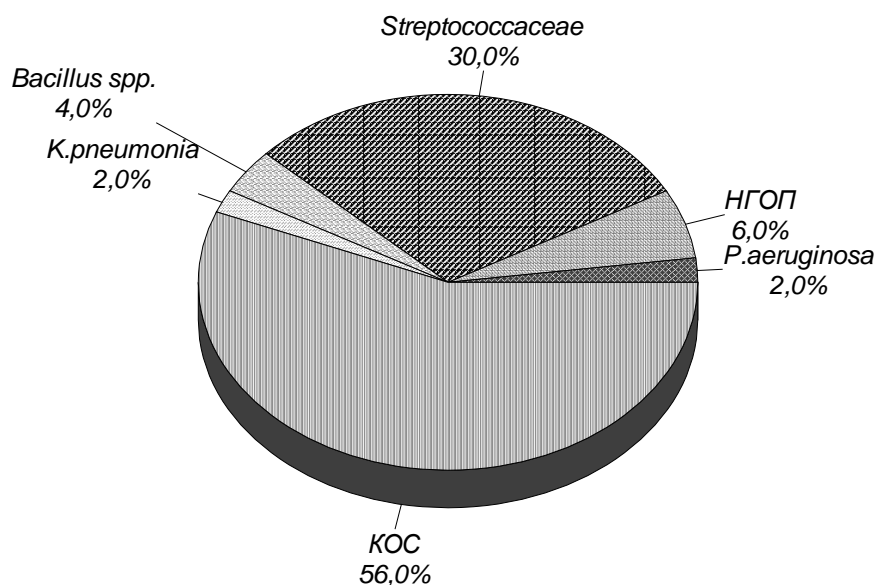


Рисунок 11.45 – Спектр микробной флоры у пациентов с травматическим остеомиелитом челюсти

Для травматического остеомиелита челюсти в отличие от данной нозологии других локализация, вызванной преимущественно золотистым стафилококком, наибольшее этиологическое значение имеет КОС и стрептококки [376].

При травматическом остеомиелите челюсти стрептококки продемонстрировали следующий уровень резистентности к антибиотикам: к цефалотину – 20%, к рифампицину – 20%, к ванкомицину – 21,5%, к ампициллину – 26,6%, тейкопланину – 33,3%, к пенициллину – 57,2%, к тетрациклину – 42%, к эритромицину – 40%, к линкомицину – 40%, к цефуроксиму – 35,7%, к ко-тримаксозолу – 50%, к нитрофурантоину – 35,7%, к оксациллину – 71,4%, к стрептомицину – 92,8%, к канамицину – 92,8%, к гентамицину – 100% (рис. 11.46).

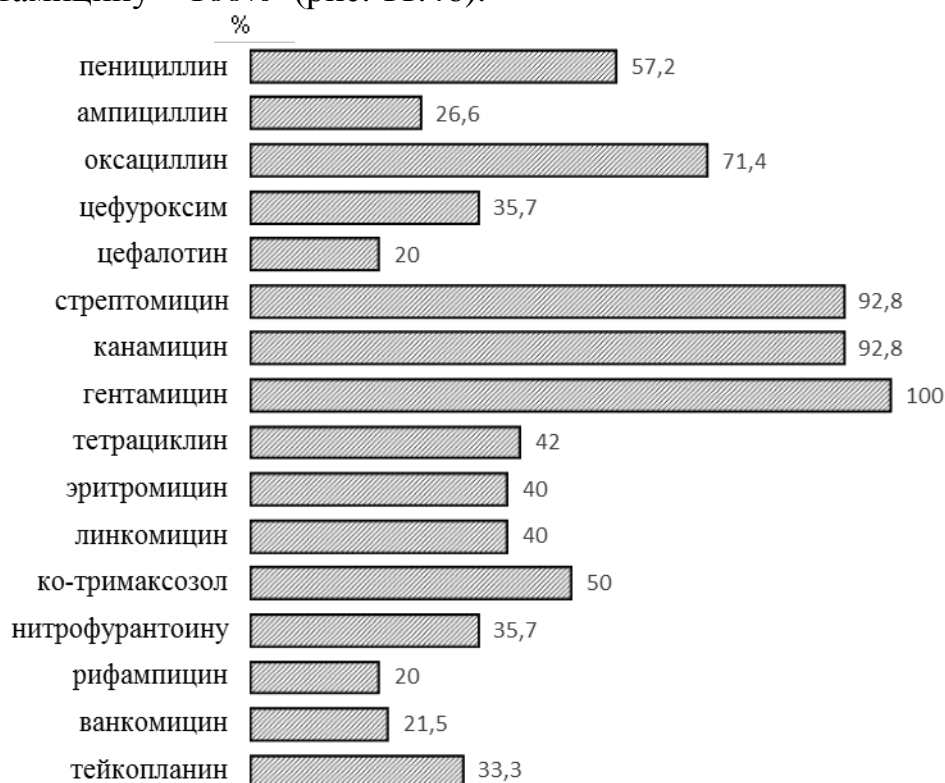


Рисунок 11.46 – Резистентность стрептококков к антибиотикам у пациентов с травматическим остеомиелитом челюсти

У пациентов с травматическим остеомиелитом челюсти (рис. 11.47) выявлено 31,5 % изолятов *MRSA*. Наименьшая устойчивость стафилококков при развитии данной патологии выявлена к ванкомицину (0%), норфлоксацину (0%), миноциклину (0%), ципрофлоксацину (5,8%), рифампицину (5,8%), офлоксацину (6,6%), цефалотину (6,6%), канамицину (7,1%), нитрофурантоину (8,3%), тобромицину (10%), новобиоцину (12,5%), пристинамицину (12,5%), пефлоксацину (13,3%), ампициллину+сульбактаму (20%), амикацину (21,4%), фосфомицину (25%), тейкопланину (25%), ко-тримаксозолу (28,5%), доксициклину (28,5%), амоксициллину+клавуланату (30,7%), клиндамицину (31,5%), хлорамфениколу (33,3%), цефотаксиму (33,3%). Более высокая

резистентность определена к цефазолину (40%), эритромицину (41,2%), гентамицину (43,7%), нетилмицину (46,6%), меропенему (50%), тетрациклину (60%), цефепиму (60%), линкомицину (60%), пенициллину (82,4%), азитромицину (100%).

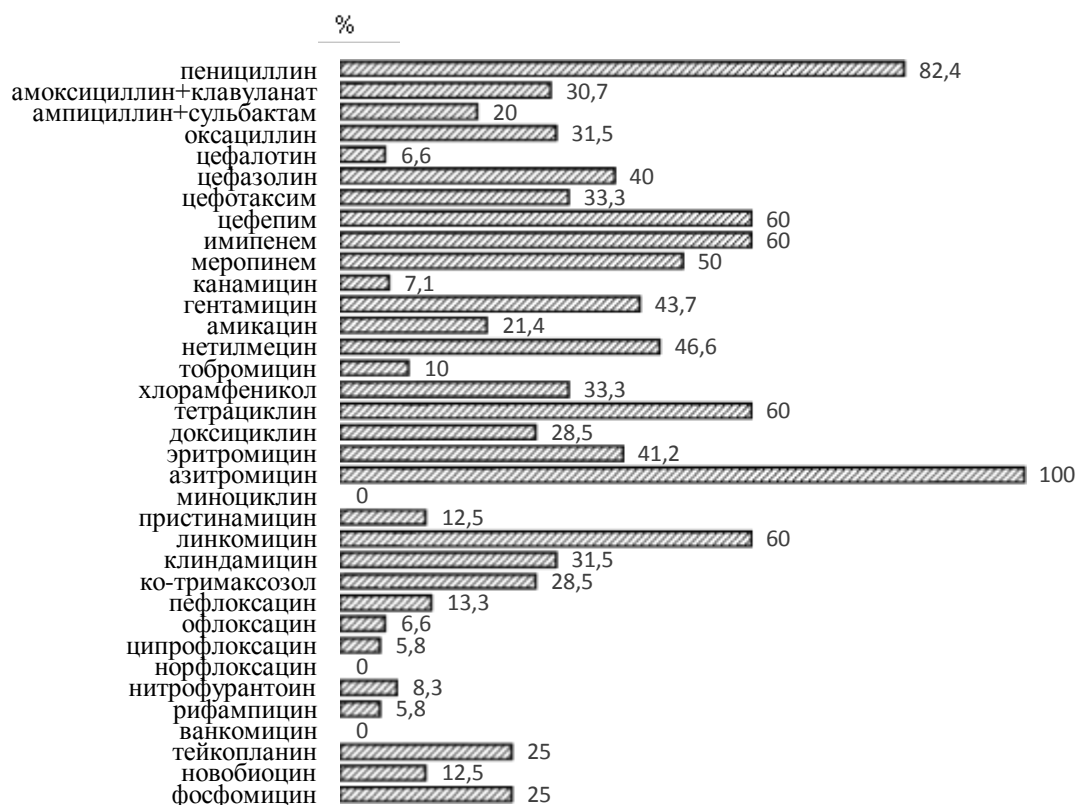


Рисунок 11.47 – Резистентность стафилококков к антибиотикам у пациентов с травматическим остеомиелитом челюсти

Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с травматическим остеомиелитом челюсти с учетом способности возбудителя формировать БП представлена в таблице 11.26.

Таблица 11.26 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с травматическим остеомиелитом челюсти с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>MSSA</i>	цефалотин	ванкомицин	тигеклицин, ципрофлоксацин
<i>MRSA</i>	ванкомицин	линезолид	тигеклицин, ципрофлоксацин
<i>Streptococcus spp.</i>	цефалотин	ванкомицин	тигеклицин
состав микрофлоры не известен	цефотоксим	ванкомицин	тигеклицин

### 11.11 Гнойные раны

От 92 пациентов с гнойными ранами выделено 64 (56,4%) микроорганизма представителя рода *Staphylococcus*, 24 изолята (21,4%) – семейства *Enterobacteriaceae*, 15 изолятов (13,2%) – семейства *Pseudomonadaceae*, 8 изолятов (7%) – представителей рода *Streptococcus* и 2 изолята (1,7%) НГОП (исключая псевдомонады). Отрицательные результаты посевов получены в 19 случаях (20,6%). Спектр микроорганизмов-возбудителей у пациентов с гнойными ранами представлен на рисунке 11.48.

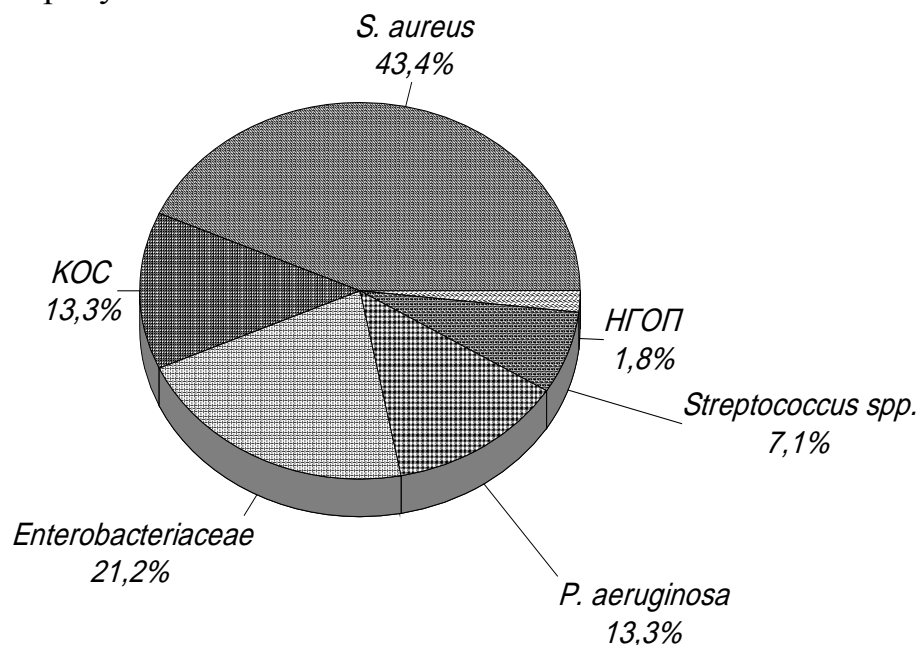


Рисунок 11.48 – Спектр микробной флоры у пациентов с гнойными ранами

Стафилококки были представлены *S.aureus* – 49 изолятов (43,3%) и КОС – 15 (13,2%). Последние были идентифицированы как *S.capitis* – 4 изолята (3,5%), *S.epidermidis* – 3 (2,6%), *S.chromogenes* – 2 (1,8%). *S.haemolyticus*, *S.xylosum*, *S.lentus*, *S.sciuri*, *S.simulans*, *S.warneri* идентифицировано по одному изоляту (0,9%).

Энтеробактерии определены как *P.mirabilis* – 7 изолятов (6,2%), *P.vulgaris* – 1 (0,9%), *E.cloacae* – 5 (4,4%), *E.aerogenes* – 1 (0,9%), *Leclercia adecarboxylata* 1 (0,9%), *S.marcescens* – 1 (0,9%), *E.coli* – 2 (1,8%) и клебсиеллы: *K.oxytoca*, *K.pneumoniae* – по 2 (1,8%), *K.planticola*, *K.ornithinolytica* – по одному изоляту (0,88%).

Псевдомонады были представлены *P.aeruginosa*, а представители рода *Streptococcus* идентифицированы как *S.pyogenes* – 7 (6,2%) и *S.agalactiae* – 1 изолят (0,9%).

НГОП были идентифицированы как *A. baumannii* и *X.maltophilia* – по 1 изоляту. В 55,7% случаев (63 изолята) выделялся только один вид бактерий, а в 44,2% (50 изолятов) обнаружены микробные ассоциации, что представлено в таблице 11.27.

Таблица 11.27 – Ассоциации микробной флоры, способной формировать биопленку, у пациентов с гнойными ранами

Ассоциация	Количество	Вероятность формирования БП
<i>S.aureus</i> + <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	10	80-100%
KOC+ <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	2	80-100%
KOC+ <i>P.aeruginosa</i>	4	50-80%
<i>P.aeruginosa</i> + <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	2	80-100%
<i>S.aureus</i> + <i>P.aeruginosa</i>	2	50-80%
<i>S.aureus</i> + <i>S.sciuri</i>	1	50-70%
<i>S.aureus</i> + <i>S.pyogenes</i>	1	50-70%
<i>S.aureus</i> + <i>K.pneumoniae</i> + <i>P.aeruginosa</i>	1	80-100%
<i>S.aureus</i> + <i>S.pyogenes</i> + <i>X. maltophila</i>	1	80-100%
Всего	24	-

Сочетание энтеробактерий и *S.aureus* было наиболее часто встречающейся микробной ассоциацией (41,66%).

При локализации ран на груди, голове, верхних конечностях стафилококки встречались наиболее часто по сравнению с ранами нижних конечностей и передней брюшной стенки. Та же ситуация наблюдалась и в отношении золотистого стафилококка. Синегнойная палочка идентифицирована достоверно чаще при расположении ран на передней брюшной стенке и нижних конечностях (табл. 11.28).

Таблица 11.28 – Спектр наиболее часто выделяемых микроорганизмов у пациентов с гнойными ранами в зависимости от локализации процесса

Микрофлора	Голова, грудь, в/конечности		Передняя брюшная стенка, н/конечности		p
	Абс.	Отн. %	Абс.	Отн. %	
<i>Staphylococcus spp.</i>	39	69,64	25	43,86	<0,01
<i>S.aureus</i>	31	55,36	18	31,58	<0,05
KOC	8	14,29	7	12,28	>0,05
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	10	17,86	14	24,56	>0,05
<i>Proteus spp.</i>	2	3,57	6	10,53	>0,05
<i>Enterobacter spp.</i>	5	8,93	1	1,75	>0,05
<i>Klebsiella spp.</i>	2	3,57	4	7,02	>0,05
<i>E.coli</i>	1	1,79	1	1,75	>0,05
<i>S. marcescens</i>	-	-	1	1,75	>0,05
<i>L. adecarboxylata</i>	-	-	1	1,75	>0,05
<i>P. aeruginosa</i>	2	3,57	13	22,81	<0,01

Микрофлора	Голова, грудь, в/конечности		Передняя брюшная стенка, н/конечности		p
	Абс.	Отн. %	Абс.	Отн. %	
<i>Streptococcus spp.</i>	4	7,14	4	7,02	>0,05
НГОП	1	1,79	1	1,75	>0,05
Всего изолятов	56	100	57	100	>0,05

Изоляты *S.aureus* продемонстрировали наименьшую резистентность к имипенему (0%), меропенему (0%), цефотаксиму (0%), цефалотину (5%), офлоксацину (11,1%), норфлоксацину (11,7%), ципрофлоксацину (14,2%), пефлоксацину (16,6%), рифампицину (17,8%), ванкомицину (22,5%), цефазолину (25%).

Более высокий уровень резистентности *S.aureus* выявлен к клиндамицину (35,7%), нетромицину (37,5%), доксициклину (37,5%), ко-тримоксазолу (39,1%), гентамицину (43,3%), оксациллину (46,4%), ампициллину+сульбактаму (48%), амоксициллину+клавуланату (58,33%), амикацину (58,6%), эритромицину (62%), линкомицину (65,52%). Высокий уровень устойчивости определен к канамицину (75%), тетрациклину (83,3%), хлорамфениколу (89,4%), пенициллину (96,55%), азитромицину – 100% устойчивых изолятов (рис. 11.49).

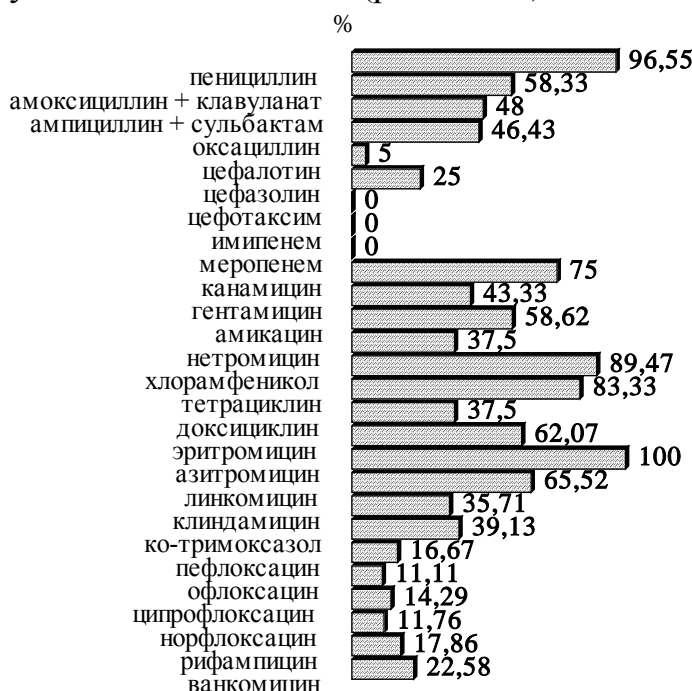


Рисунок 11.49 – Резистентность *S.aureus* к антибиотикам у пациентов с гнойными ранами

КОС оказались наименее устойчивы к цефалотину (0%), ампициллину+сульбактаму (0%), имипенему (0%), меропенему (0%), амикацину (0%), нетромицину (0%), ванкомицину (14,3%), гентамицину (14,3%), рифампицину (16,6%), офлоксацину (16,6%),



амоксциллину+клавуланату (16,7%), канамицину (20%), норфлоксацину (20%), ко-тримоксазолу (33,3%), пефлоксацину (33,3%), ципрофлоксацину (42,8%), оксациллину (42,8%).

Более высокий уровень резистентности определен к линкомицину (57,1%), тетрациклину (60%), клиндамицину (71,4%), хлорамфениколу (80%), эритромицину (85,7%), пенициллину (100% резистентных изолятов). По сравнению с золотистым стафилококком КОС (рис. 11.50) были более чувствительны к амоксициллину+клавуланату, канамицину ( $p<0,05$ ), а также к ампициллину+сульбактаму, амикацину, нетромицину ( $p<0,001$ ).



Рисунок 11.50 – Резистентность КОС к антибиотикам у пациентов с гнойными ранами

Энтеробактерии продемонстрировали низкую резистентность к имипенему (0%), офлоксацину (0%), ципрофлоксацину (0%), нетромицину (4,76%), пефлоксацину (5,2%), пиперациллину (9,09%), амикацину (9,5%), цефтазидиму (10,5%), гентамицину (14,3%), азтреонаму (14,29%), цефотаксиму (15%), ко-тримоксазолу (19,05%), тикарциллину (33,3%), канамицину – 41,67% резистентных изолятов. Более высокая резистентность была выявлена к мециллинаму (45,4%), цефокситину (50%), цефуроксиму (53,8%), амоксициллину+клавуланату (55%), цефалотину (68,4%), хлорамфениколу (69,2%), амоксициллину (70%), тетрациклину – 77,78% резистентных изолятов (рис. 11.51).

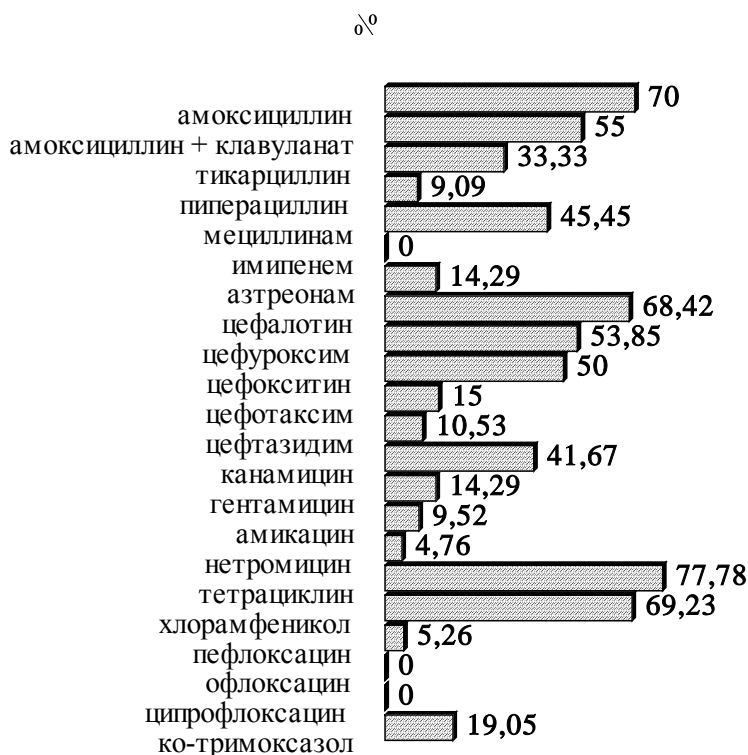


Рисунок 11.51 – Резистентность энтеробактерий к антибиотикам у пациентов с гнойными ранами

Изоляты псевдомонад были наименее резистентны к имипенему (20%), амикацину (30%), ципрофлоксацину (30%), пиперациллину – 55,56% устойчивых изолятов.

Высокая устойчивость наблюдалась к пемфлосакцину (77,8%), азтреонаму (80%), гентамицину (80%), офлосакцину (88,9%), тикарциллину (88,9%), цефтазидиму (88,9%), нетромицину (90%), ко-тримоксазолу – 90% резистентных изолятов.

Стрептококки были наименее резистентны к ванкомицину, рифампицину, стрептомицину, канамицину, гентамицину – 0% резистентных изолятов, цефуроксиму (12,5%), цефалотину (14,29%), ампициллину (25%), пенициллину (25%), ко-тримоксазолу (25%), эритромицину (37,5%), линкомицину (37,5%).

Высокая степень устойчивости выявлена в отношении оксациллина (62,5%), тетрациклина (75%).

Резистентность стрептококков и псевдомонад к антибиотикам представлена на рисунках 11.52 и 11.53 [357].

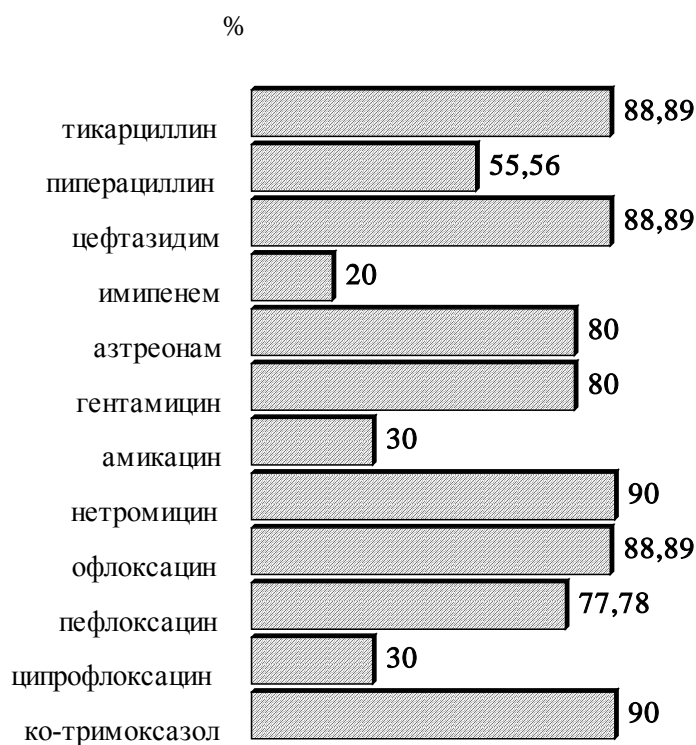


Рисунок 11.52 – Резистентность псевдомонад к антибиотикам у пациентов с гнойными ранами

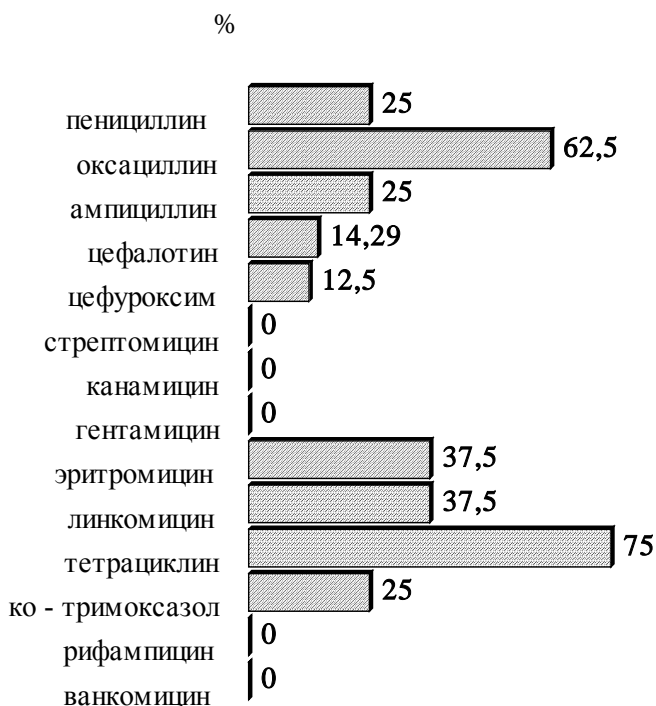


Рисунок 11.53 – Резистентность стрептококков к антибиотикам у пациентов с гнойными ранами

На основании полученных данных разработана схема рациональной эмпирической антибиотикотерапии пациентов с гнойными ранами с учетом способности формировать БП (табл. 11.29).

Таблица 11.29 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с гнойными ранами с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>S. aureus</i> (более частое присутствие на голове, груди, в/конечностях)	цефалоспорины 1 поколения (цефалотин, цефазолин); цефотаксим	ванкомицин; карбапенемы	ципрофлоксацин, тигециклин
КОС	цефалотин; ампициллин+ сульбактам; амоксициллин+ клавуланат	ванкомицин; фторхинолоны; карбапенемы	ципрофлоксацин
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	аминогликозиды (гентамицин, амикацин, нетромицин) цефтазидим; цефотаксим	фторхинолоны; карбапенемы	тигециклин
<i>Pseudomonadaceae spp.</i> (более частое присутствие на брюшной стенке, н/конечностях)	амикацин	ципрофлоксацин; карбапенемы	колистин
<i>Streptococcus spp.</i>	пенициллин; ампициллин	цефалотин; цефуросим; ванкомицин	ципрофлоксацин
<i>S.aureus</i> + <i>Enterobacteriaceae spp.</i>	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефалотин); гентамицин + цефтазидим; нетромицин + цефотаксим	фторхинолоны	тигециклин
состав микрофлоры не известен	амикацин + цефалоспорин 1 поколения (цефалотин)	фторхинолоны; карбапенемы	ципрофлоксацин; тигециклин

### 11.12 Лимфадениты челюстно-лицевой области

У пациентов с лимфаденитами челюстно-лицевой области выделено 21 изолят (72%) стафилококков, 6 изолятов (21%) стрептококков, 1 изолят *P. aeruginosa* (3,5%), 1 изолят *P. mirabilis* (3,5%).

Стрептококки идентифицированы как *Streptococcus spp.* (16,6%),  $\alpha$ -

гемолитический стрептококк (33,33%), негемолитический стрептококк – 16,66%. *S. haemolyticus* выделен в 16,66% случаев, *E. faecalis* – в 16,66%. Гемолитические стрептококки составили 49,99% среди возбудителей-стрептококков лимфаденитов челюстно-лицевой области. Среди стафилококков-возбудителей лимфаденитов челюстно-лицевой области *S.aureus* составил 9,53%, КОС – 90,47%. Последние были идентифицированы (рис. 11.54) как *Staphylococcus spp.* (4,76%), *S. epidermidis* (52,38%), *S. chromogenes* (9,52%), *S. capitis* (9,52%), *S. hominis* (9,52%), *S. equorum* (4,76%).

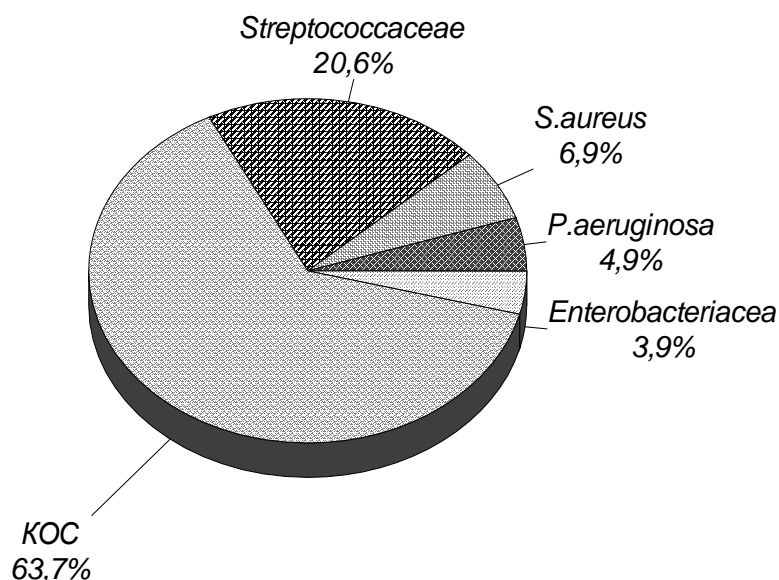


Рисунок 11.54 – Спектр микробной флоры у пациентов с лимфаденитами челюстно-лицевой области

Стрептококки (рис. 11.55) у пациентов с лимфаденитами челюстно-лицевой области продемонстрировали наименьшую резистентность к рифампицину (0%), тейкопланину (16,6%), нитрофурантоину (16,6%), ванкомицину (16,6%), тетрациклину (26,6%), ко-тримаксозолу (26,6%), цефалотину (33,3%), ампициллину (33,3%). Более высокий уровень устойчивости стрептококков выявлен к линкомицину (60%), канамицину (66,6%), стрептомицину (80,0%), оксациллину (83,3%), пенициллину (83,3%), эритромицину (83,3%), цефуроксиму (83,3%), гентамицину (100%).

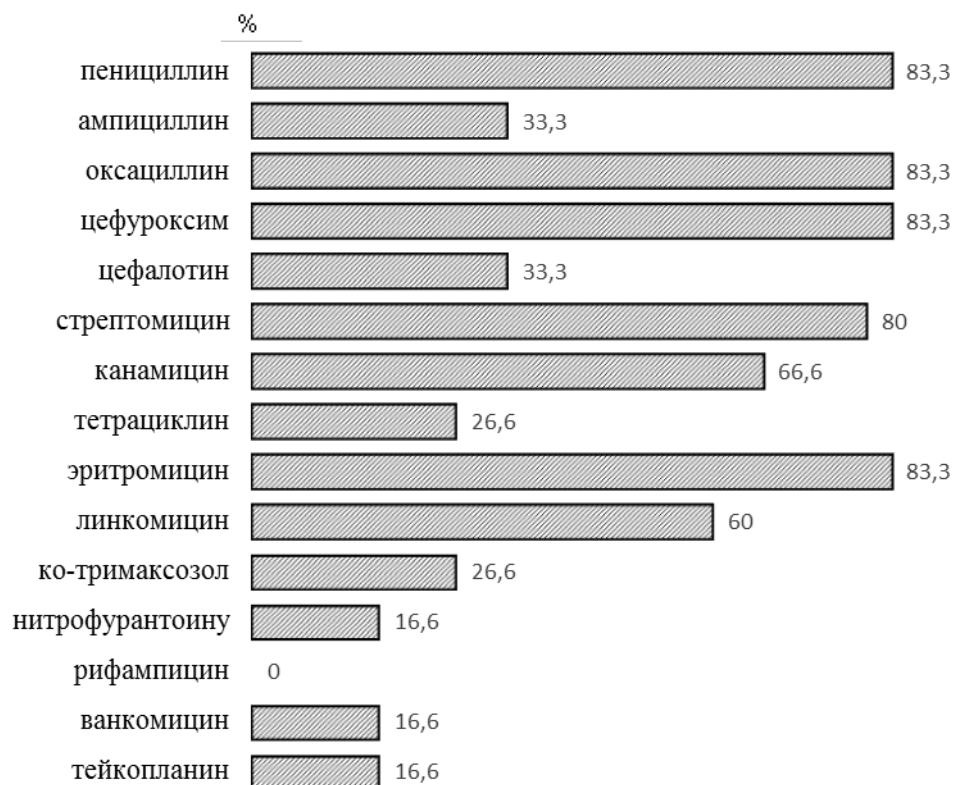


Рисунок 11.55 – Резистентность стрептококков к антибиотикам у пациентов с лимфаденитами челюстно-лицевой области

При лимфаденитах челюстно-лицевой области выявлено 41,1 % метициллин-резистентных изолятов стафилококков. У пациентов с данной патологией выявлена низкая резистентность стафилококков к ванкомицину (0%), фосфомицину (0%), пефлоксацину (0%), ципрофлоксацину (6,6%), офлоксацину (8,4%), рифампицину (9%), меропенему (16,6%), норфлоксацину (20%), цефалотину (22,2%), цефазолину (25%), канамицину (25%), нетилмицину (25%), гентамицину (26,6%), ампициллину+сульбактаму (30%), новобиоцину (33,3%), амоксициллину+клавуланату (33,3%), тобромицину (33,3%), амикацину (33,3%), нитрофурантоину (33,3%). Более высокая устойчивость стафилококков выявлена к ко-тримаксозолу (40%), пристинамицину (40%), доксициклину (44,4%), цефепиму (50%), имипенему (50%), линкомицину (57,3%), миноциклину (60%), клиндамицину (60%), эритромицину (70%), азитромицину (75%), хлорамфениколу (80%), цефотаксиму (80%), тетрациклину (83,3%), тейкопланину (83,3%), пенициллину (91%) (рис.11.56).

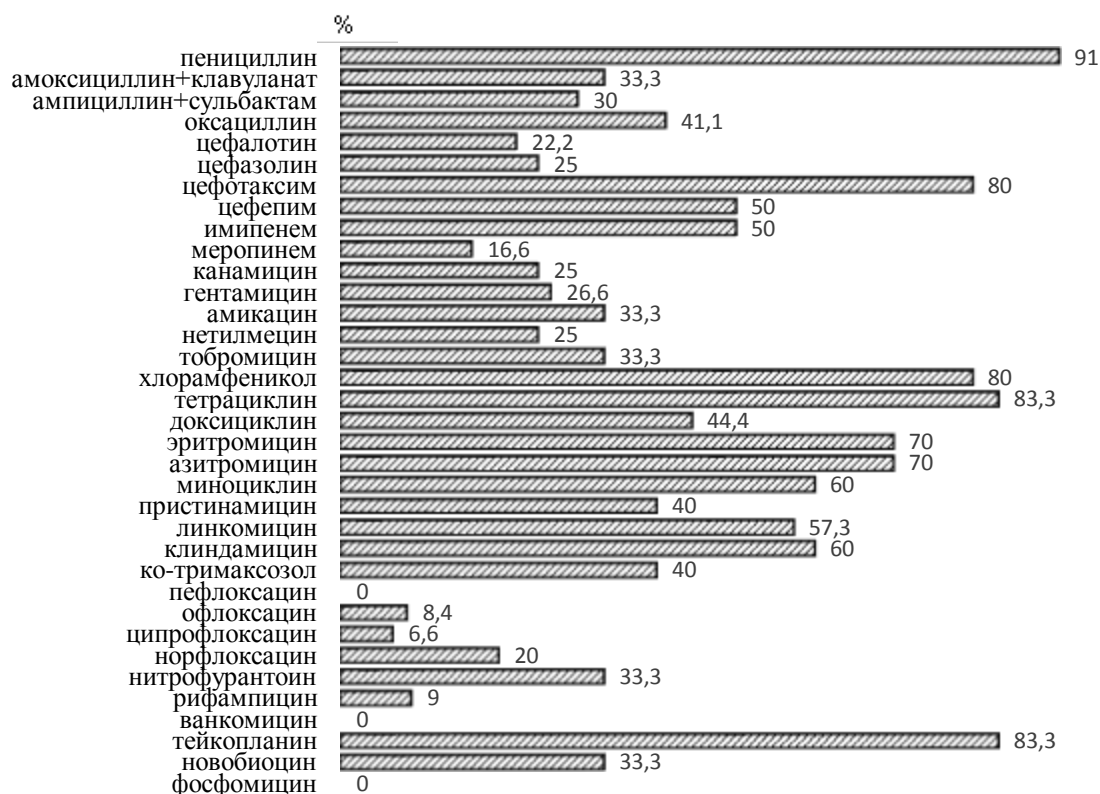


Рисунок 11.56 – Резистентность стафилококков к антибиотикам у пациентов с лимфаденитами челюстно-лицевой области

На основании полученных данных разработана схема рациональной эмпирической антибиотикотерапии лимфаденитов челюстно-лицевой области с учетом способности возбудителя формировать БП (табл. 11.30).

Таблица 11.30 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с лимфаденитами челюстно-лицевой области с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>MSSA</i>	цефалотин, цефазолин	ванкомицин	ципрофлоксацин
<i>MRSA</i>	ванкомицин	линезолид	тигециклин, ципрофлоксацин
<i>Streptococcus spp.</i>	цефалотин, ампициллин	ванкомицин, тейкопланин	тигециклин
состав микрофлоры не известен	цефалотин	ванкомицин	тигециклин

### 11.13 Периостит челюсти

У пациентов с острым гнойным одонтогенным периоститом челюсти выделено 11 изолятов стрептококков (69%), 4 изолята стафилококков (25%), 1 изолят *E.coli* (6%). У пациентов с данной патологией стрептококки

идентифицированы как  $\alpha$ -гемолитический стрептококк в 54,55% случаев. С помощью тест-систем выделены *S. gordonii* (9,09%), *S. intermedius* (9,09%), *S. oralis* (9,09%). Идентифицированы представители рода *Gemella* – *G. haemolysans* (9,09%), *G. morbillorum* (9,09%). Стафилококков идентифицированы как *S. aureus* (25%) и КОС (75%), среди которых *S. chromogenes* (50%) и *S. equorum* (25%), не выделено ни одного изолята эпидермального стафилококка (рис. 11.57).

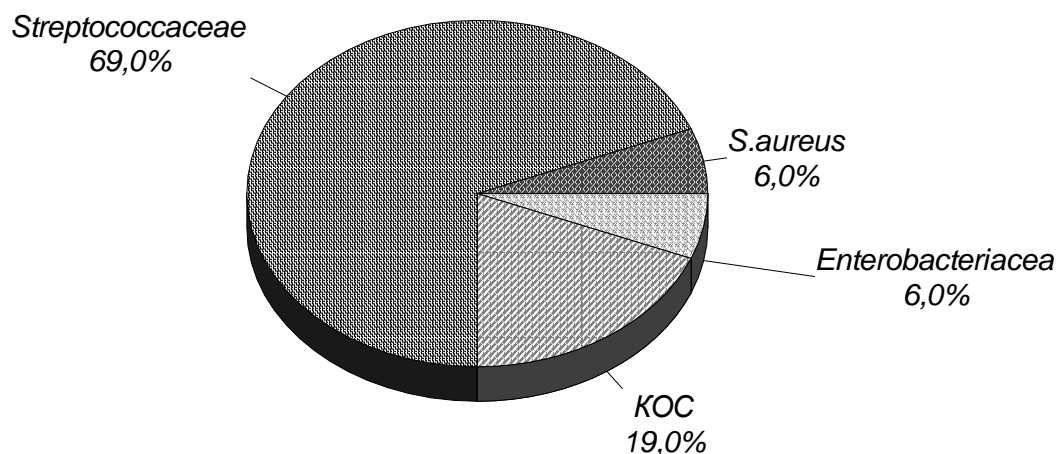


Рисунок 11.57 – Спектр микробной флоры у пациентов с острым гнойным одонтогенным периоститом челюсти

При остром гнойном одонтогенном периостите челюсти стрептококки продемонстрировали следующие показатели резистентности к антибиотикам: к стрептомицину – 100%, к канамицину – 100%, к гентамицину – 100%, к оксациллину – 100%, к пенициллину – 100%, к тетрациклину – 88,8%, к эритромицину – 77,7%, к линкомицину – 66,6%, к цефуроксиму – 66,6%, к ко-тримаксозолу – 77,7%, к ампициллину – 66,6%, к тейкопланину – 44,4%, к ванкомицину – 83,3%, к цефалотину – 44,4%, к нитрофурантоину – 33,3%, к рифампицину – 11,1% (рис. 11.58).



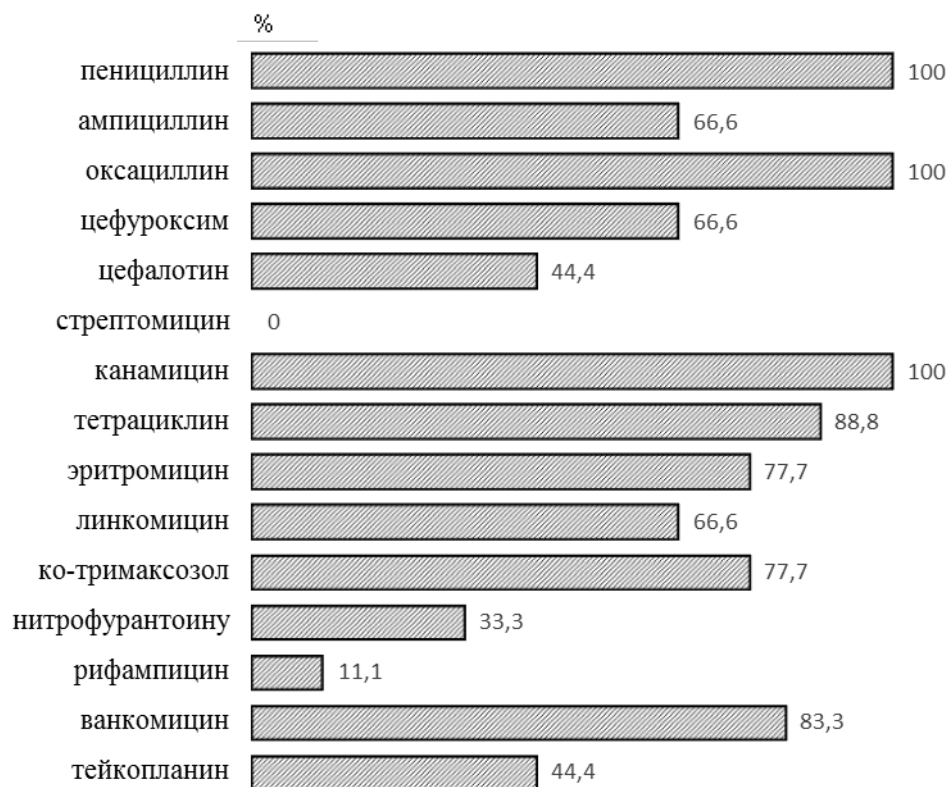


Рисунок 11.58 – Резистентность стрептококков к антибиотикам у пациентов с острым гнойным одонтогенным периоститом челюсти

При данной патологии выявлено 50% метициллин-резистентных изолятов стафилококков. У пациентов с острым гнойным одонтогенным периоститом челюсти наименьшая резистентность определена к цефалотину (0%), ванкомицину (0%), клиндамицину (0%), пефлоксацину (0%), офлоксацину (0%), ципрофлоксацину (0%), рифампицину (0%), цефазолину (0%), цефотаксиму (0%), амикацину (25%), гентамицину (25%), эритромицину (25%). Более высокий уровень устойчивости выявлен к амоксициллину+клавуланату (50%), ампициллину+сульбактаму (50%), линкомицину (50%), ко-тримаксозолу (50%), доксициклину (50%), меропенему (66,6%). К канамицину, пенициллину, тобромицину, нетилмицину, хлорамфениколу, тетрациклину, миноциклину, пристинамицину, нитрофурантоину, фосфомицину, тейкопланину, новобиоцину, норфлоксацину, цефепиму, имипенему и азитромицину выявлена 100% резистентность (рис. 11.59).

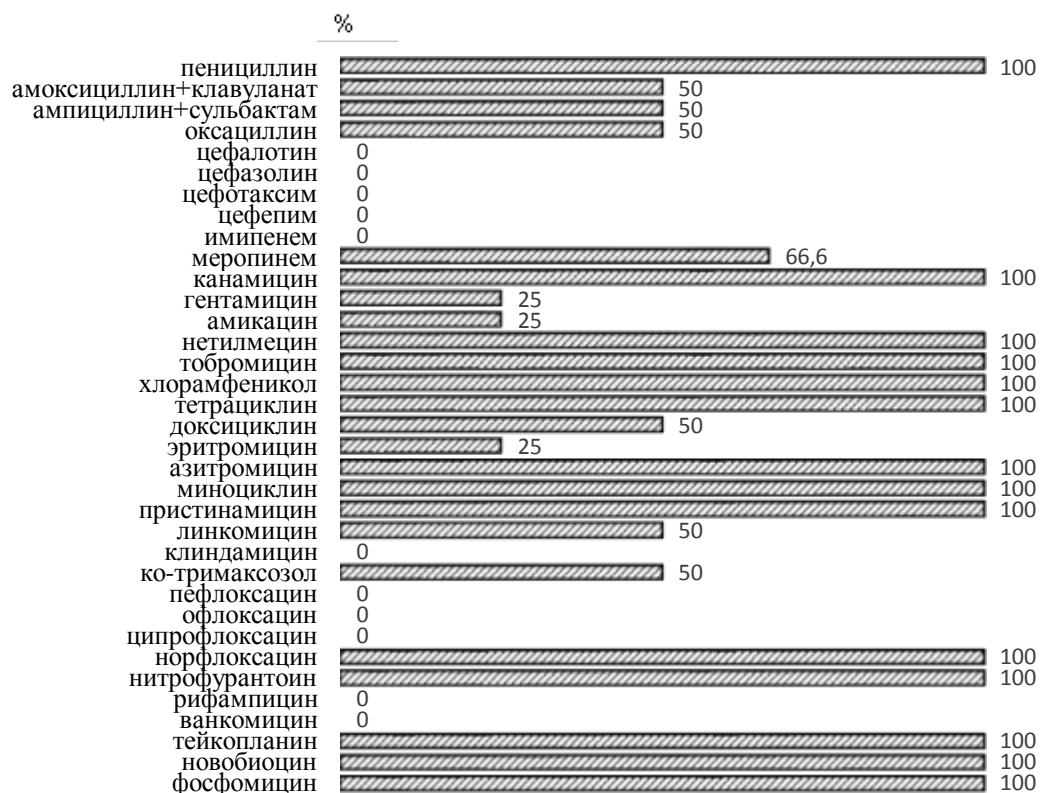


Рисунок 11.59 – Резистентность стафилококков к антибиотикам у пациентов с острым гнойным одонтогенным периоститом челюсти

На основании полученных данных разработана схема рациональной эмпирической антибиотикотерапии острого гнойного одонтогенного периостита челюсти с учетом способности возбудителя формировать БП (табл. 11.31).

Таблица 11.31 – Схема эмпирической антибиотикотерапии пациентов с острым гнойным одонтогенным периоститом челюсти с учетом способности возбудителя формировать биопленку

Микроорганизмы	Препараты 1 ряда	Препараты 2 ряда	С учетом формирования БП
<i>MSSA</i>	цефалотин, клиндамицин, цефазолин, цефотаксим	ванкомицин	тигециклин ципрофлоксацин
<i>MRSA</i>	ванкомицин	линезолид	тигециклин ципрофлоксацин
<i>Streptococcus spp.</i>	цефазолин	линезолид	тигециклин
состав микрофлоры не известен	цефалотин, клиндамицин	ванкомицин	тигециклин

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

На сегодняшний день клиническая микробиология представляет собой динамично развивающуюся отрасль теоретической и практической медицины. Образование биопленки в ране, а также на поверхностях имплантируемых устройств, шовного материала, кариозной полости приводит к снижению эффективности проводимого лечения. Результаты исследований, представленные в монографии, посвящены изучению способности возбудителей формировать микробные сообщества, и разработке новых методов выявления и воздействия на биопленки. На основании изучения чувствительности возбудителей с учетом их способности формировать биопленку предложены алгоритмы антибиотикотерапии хирургических инфекционно-воспалительных заболеваний.

Понимание структуры и функционирования биопленок, а также разработка и внедрение в клиническую медицину новых методов диагностики, предотвращения формирования и способов разрушения микробных сообществ позволит вывести качество оказания медицинской помощи пациентам с инфекционной патологией на совершенно новый уровень.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Palmer, R.J.Jr. Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases / R.J.Jr. Palmer, P. Stoodley // *J. Bacteriol.* – 2007. – Vol. 189, N 22. – P. 7948–7960.
2. Donlan, R.M. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner / R.M. Donlan // *Clin. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 52, N 8. – P. 1038–1045.
3. Антибиотикопрофилактика и антибиотикотерапия основных форм хирургических инфекций : метод. рек. / ГВМУ МО РФ, РАСХИ. – М., 2004. – 26 с.
4. Беденков, А.В. Фармакоэпидемиологическая и фармакоэкономическая оценка периоперационной антибиотикопрофилактики в абдоминальной хирургии : автореф. дис ... канд. мед. наук : 14.00.25 / А.В. Беденков ; Смол. гос. мед. акад. – Смоленск, 2003. – 23 с.
5. Стандартные операционные процедуры: микробиологическая диагностика госпитальных инфекций / Я.Б. Бейкин [и др.] // *Инфекции в хирургии.* – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 19–27.
6. Тимербулатов, В.М. Руководство районного хирурга / В.М. Тимербулатов. – Уфа : Информреклама, 2000. – 403 с.
7. Супотницкий, М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М.В. Супотницкий // *Биопрепараты.* – 2011. – № 2. – С. 4–44.
8. Туркутюков, В.Б. Молекулярно-генетический мониторинг резистентности микроорганизмов к антибиотикам / В.Б. Туркутюков // *Тихоокеан. мед. журн.* – 2011. – № 2. – С. 28–31.
9. Mariani-Kurkdjian, P. Extended-spectrum beta-lactamase producing-enterobacteriaceae / P. Mariani-Kurkdjian, C. Doit, E. Bingen // *Arch. Pediatr.* – 2012 Nov. – Vol. 19, N 3. – P. 93–96.
10. Warnes, S.L. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: implications for public health / S.L. Warnes, C.J. Highmore, C.W. Keevil // *MBio.* – 2012 Nov. – Vol. 3, N 6.
11. Leg ulcers: epidemiology and aetiology / S.V. Cornwall [et al.] // *Br. J. Surg.* – 1986. – Vol. 73, N 9. – P. 693–696.
12. Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2000. – Vol. 64, N 4. – P. 847–867.
13. Анализ микробного пейзажа в современном стационаре / Л.З. Скала [и др.] // *Альм. клин. медицины.* – 2011. – № 24. – С. 61–66.
14. Яковлев, В.П. Изучение цефепима в России / В.П. Яковлев, С.В. Яковлев // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2004. – Т. 49, № 10. – С. 30–38.
15. Белобородова, Н.В. Роль микробных сообществ или биопленок в кардиохирургии / Н.В. Белобородова, И.Т. Байрамов // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2008. – Т 53, № 11/12. – С. 44–59.
16. Mah, T.-F.C. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents / T.-F.C. Mah, G.A. O'Toole // *Trends Microbiol.* – 2001. – N 9. – P. 34–39.

17. Окулич, В.К. Роль микробных биоплёнок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе / В.К. Окулич, Ф.В. Плотников, А.А. Кабанова // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – № 4. – С. 70–82.
18. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains, role of flagella, curli and colanic acid / C. Prigent-Combaret [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 2, N 4. – P. 450–464.
19. A stochastic mechanism for biofilm formation by *Mycoplasma pulmonis* / W.L. Simmons [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2007. – Vol. 189, N 3. – P. 1905–1913.
20. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // *Травматология и ортопедия России.* – 2011. – № 3. – С. 119–125.
21. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix / S.S. Branda [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59, N 4. – P. 1229–1238.
22. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis* / F. Chu [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59, N 4. – P. 1216–1228.
23. A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function / M. Serrano [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181, N 12. – P. 3632–3643.
24. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation / D. Tielker [et al.] // *Microbiology.* – 2005. – Vol. 151, pt. 5. – P. 1313–1323.
25. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* / S.P. Diggle [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 8, N 6. – P. 1095–1104.
26. Lsa, I. Bap, a family of surface proteins involved in biofilm formation / I. Lasa, J.R. Penadés // *Res. Microbiol.* – 2005. – Vol. 157, N 2. – P. 99–107.
27. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract / X. Zogaj [et al.] // *Infect. Immun.* – 2003. – Vol. 71, N 7. – P. 4151–4158.
28. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation / C. Cucarella [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183, N 9. – P. 2888–2896.
29. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues / J.M. Patti [et al.] // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1994. – Vol. 48. – P. 585–617.
30. Dubnau, D. DNA uptake in bacteria / D. Dubnau // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1999. – Vol. 53. – P. 217–244.
31. Steinmoen, H. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population / H. Steinmoen, E. Knutsen, L.S. Håvarstein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, N 11. – P. 7681–7686.
32. Lorenz, M.G. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment / M.G. Lorenz, W. Wackernagel // *Microbiol. Rev.* – 1994. – Vol. 58, N 3. – P. 563–602.

33. Palmen, R. *Acinetobacter calcoaceticus* liberates chromosomal DNA during induction of competence by cell lysis / R. Palmen, K.J. Hellingwerf // *Curr. Microbiol.* – 1995. – Vol. 30, N 1. – P. 7–10.
34. Stewart, G.J. Evidence for an active role of donor cells in natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* / G.J. Stewart, C.A. Carlson, J.L. Ingraham // *J. Bacteriol.* – 1983. – Vol. 156, N 1. – P. 30–35.
35. Allesen-Holm, M. A characterization of DNA-release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms / M. Allesen-Holm, B. Barken, L. Yang // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59, N 4. – P. 1114–1128.
36. Popat, R. Quorum-sensing and cheating in bacterial biofilms / R. Popat, S.A. Crusz, M. Messina // *Proc. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 279, N 1748. – P. 4765–4771.
37. Costa, J.C. Increased production of biofilms by *Escherichia coli* in the presence of enrofloxacin / J.C. Costa, I.F. Espeschit, F. Pieri // *Vet. Microbiol.* – 2012. – Vol. 160, N 3/4. – P. 488–490.
38. Costerton, J.W. *The Biofilm Primer* / J.W. Costerton. – Berlin : Springer, 2007.
39. Dillard, J.P. A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates / J.P. Dillard, H.S. Seifert // *Mol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 41, N 1. – P. 263–277.
40. Покровский, В.И. Поражения нервной системы при инфекционных болезнях / В.И. Покровский // *Терапевт. архив.* – 2008. – № 11. – С. 5–6.
41. Ройхель, В.М. Прионные болезни на современном этапе и исследования, проводимые в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН / В.М. Ройхель, В.В. Погодина, В.Я. Кармышева // *Вопр. вирусологии.* – 2005. – № 3. – С. 23–26.
42. Characterization of Biofilm Formation by *Borrelia burgdorferi* In Vitro / E. Sapi [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, N 10. – P. e48277.
43. Arai, T. *Actinomyces naeslundii* GroEL-dependent initial attachment and biofilm formation in a flow cell system / T. Arai, K. Ochiai, H. Senpuku // *J. Microbiol. Methods.* – 2015. – Vol. 109. – P. 160–166.
44. Simmons, W.L. *Mycoplasma* Biofilms Ex Vivo and In Vivo / W.L. Simmons, K. Dybvig // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – Vol. 295, N 1. – P. 77–81.
45. Biofilm Matrix Exoproteins Induce a Protective Immune Response against *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection / G. Carmen [et al.] // *Infect. Immun.* – 2014. – Vol. 82, N 3. – P. 1017–1029.
46. Лысак, В.В. *Микробиология : учеб. пособие* / В.В. Лысак. – Минск : БГУ, 2007. – 426 с.
47. Березов, Т.Т. *Биологическая химия : учебник.* – 3-е изд., перераб. и доп. / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М. : Медицина, 1998. – 704 с.
48. Darwish, S.F. Investigation of Biofilm Forming Ability in *Staphylococci* Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays / S.F.

- Darwish, H.A. Asfour // *Scientific World Journal*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 378492.
49. Garrity, D.B. The Proteobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / J.B. Garrity, N.R. Krieg, J.T. Staley. – New York : Springer, 2005. – Vol. 2 : The Proteobacteria (Part C). – 1256 p.
50. Zzaman, S. Reconstitution of F factor DNA replication in vitro with purified proteins / S. Zzaman, M.M. Abhyankar, D. Bastia // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, N 17. – P. 17404–17410.
51. From simple bacterial and archaeal replicons to replication N/U-domains / O. Hyrien [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 425, N 23. – P. 4673–4689.
52. Bacterial plasmids / B. Miljkovic-Selimovic [et al.] // *Acta Medica Medianae*. – 2007. – Vol. 46, N 4. – C. 61–65.
53. Yang, X. The R1 Conjugative Plasmid Increases *Escherichia coli* Biofilm Formation through an Envelope Stress Response / X. Yang, Q. Ma, T.K. Wood // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74, N 9. – P. 2690–2699.
54. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in *Enterobacteriaceae* strains / M. Burmolle [et al.] // *Microbiology*. – 2008. – Vol. 154, pt. 1. – P. 187–195.
55. TOL plasmid carriage enhances biofilm formation and increases extracellular DNA content in *Pseudomonas putida* KT2440 / P.W. D'Alvise [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2010. – Vol. 312, N 1. – P.84–92.
56. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms / K. Driffield [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2008. – Vol. 61, N 5. – P. 1053–1056.
57. Boles, B.R. Self-generated diversity produces «insurance effects» in biofilm communities / B.R. Boles, M. Thoendel, P.K. Singh // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2005. – Vol. 101, N 47. – P.16630–16635.
58. Drake, J.W. Too many mutants with multiple mutations / J.W. Drake // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2007. – Vol. 42, N 4. – P. 247–258.
59. Boles, B. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities / B. Boles, P. Singh // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 105, N 34. – P.12503.
60. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria / A. Mai-Prochnow [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2008. – Vol. 190, N 15. – P. 5493–5501.
61. Cvitkovitch, D.G. Genetic exchange in biofilms / D.G. Cvitkovitch // *Microbial Biofilms* / ed. M. Ghannoum, G. O'Toole. – Washington : ASM Press, 2004. – P. 192–205.
62. Жимулев, И.Ф. Общая и молекулярная генетика / И.Ф. Жимулев. – Новосибирск : Сибир. унив. изд-во, 2007. – 479 с.
63. Dunny, G.M. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication / G.M. Dunny, B.A. Leonard, P.J. Hedberg // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177, N 4. – P. 871–876.
64. Плюта, В.А. Особенности образования биопленок и Quorum Sensing регуляция при действии антибактериальных агентов : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06, 03.02.03 / В.А. Плюта. – М., 2014. – 30 с.

65. Camilli, A. Bacterial small-molecule signaling pathways / A. Bassler, B.L. Camilli // *Science*. – 2006. – Vol. 311, N 5764. – P. 1113–1116.
66. Бойченко, М.Н. Генетика бактерий (современные теоретические и прикладные вопросы) / М.Н. Бойченко. – М., 1997. – 41 с.
67. Matsukawa, M. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development / M. Matsukawa, E.P. Greenberg // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186, N 14. – P. 4449–4456.
68. Основы клинической микробиологии и иммунологии : учеб.-метод. пособие : в 2 ч. / под ред. А.П. Красильникова. – Минск, 1989. – Ч. 1 : Основы клинической микробиологии. – 61 с.
69. Пособие по иммунологии / Д.К. Новиков [и др.]. – Витебск, 1996. – 124 с.
70. Романова, Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. – 2011. – № 3. – С. 99–110.
71. Медицинская иммунология : учеб. пособие для студентов мед. ин-тов / Д.К. Новиков [и др.]. – Витебск, 1998. – 147 с.
72. Biofilms development with an emphasis on *Bacillus subtilis* / K.P. Lemon [et al.] // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* – 2008. – Vol. 322. – P. 1–16.
73. Случай легионеллезной пневмонии / Е.А. Сержант [и др.] // *Здравоохранение*. – 2016. – № 5. – С. 73–76.
74. Особенности формирования биопленок легионелл в искусственных и природных водных системах / Ю.Е. Дронина [и др.] // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2012. – № 4. – С. 76–80.
75. Stewart, G.J. Evidence for an active role of donor cells in natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* / G.J. Stewart, C.A. Carlson, J.L. Ingraham // *J. Bacteriol.* – 1983. – Vol. 156, N 1. – P. 30–35.
76. A characterization of DNA-release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms / M. Allesen-Holm [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59, N 4. – P. 1114–1128.
77. Increased production of biofilms by *Escherichia coli* in the presence of enrofloxacin / J.C. Costa [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2012. – Vol. 160, N 3/4. – P. 488–490.
78. Quorum-sensing and cheating in bacterial biofilms / R. Papat [et al.] // *Proc. Biol. Sci.* – 2012. – Vol. 279, N 1748. – P. 4765–4771.
79. Страчунский, Л.С. Современная антимикробная химиотерапия : рук. для врачей / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов. – М. : Боргес, 2002. – 432 с.
80. Moons, P. Bacterial interactions in biofilms / P. Moons, C.W. Michiels, A. Aertsen // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2009. – Vol. 35, N 3. – P. 157–168.
81. Mapping the speciation of iron in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using scanning transmission X-ray microscopy / R.C. Hunter [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – Vol. 42, N 23. – P. 8766–8772.



82. Bacterial Resistance to Antimicrobials: Mechanisms, Genetics, Medical Practice and Public Health / K. Lewis [et al.]. – New York, 2002.
83. Charsequence of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization / I.M. Saxena [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176, N 18. – P. 5735–5752.
84. Caiazza, N.C. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 / N.C. Caiazza, A. O'toole // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186, N 14. – P. 4476–4485.
85. Gotz, F. Staphylococcus and biofilms / F. Gotz // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 43, N 6. – P. 1367–1378.
86. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide / T. Maira-Litran [et al.] // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70, N 8. – P. 4433–4440.
87. Te teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesion locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus* / K.K. Jeferson [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186, N 8. – P. 2449–2456.
88. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development / M.A. Tormo [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187, N 7. – P. 2348–2356.
89. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / D.J. Wozniak [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100, N 13. – P. 7907–7912.
90. Friedman, L. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms / L. Friedman, R. Kolter // *Mol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 51, N 3. – P. 675–690.
91. Te pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation / P. Vasseur [et al.] // *Microbiology.* – 2005. – Vol. 151, pt. 3. – P. 985–997.
92. Matsukawa, M. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development / M. Matsukawa, E.P. Greenberg // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186, N 14. – P. 4449–4456.
93. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella, and type IV pili mutants / M. Klausen [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 48, N 6. – P. 1511–1524.
94. Yamada, M. Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* / M. Yamada, A. Ikegami, H.K. Kuramitsu // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – Vol. 250, N 2. – P. 271–277.
95. *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces / C.L. Giltner [et al.] // *J. Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59, N 4. – P. 1083–1096.
96. DNA Binding, a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili / E.J. van Schaik [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187, N 4. – P. 1455–1464.

97. Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili / E. Hahn [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 323, N 5. – P. 845–857.
98. Effect of Varidase (streptodornase) on biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* / K. Nemoto [et al.] // *Chemotherapy.* – 2003. – Vol. 49, N 3. – P. 121–125.
99. Pratt, L.A. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation, roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili / L.A. Pratt, R. Kolter // *Mol. Microbiol.* – 1998. – Vol. 30, N 2. – P. 285–293.
100. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms / A. Reisner [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 48, N 4. – P. 933–946.
101. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains, role of flagella, curli and colanic acid / C. Prigent-Combaret [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 2, N 4. – P. 450–464.
102. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in *rda* morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium / A. Kader [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 60, N 3. – P. 602–616.
103. Tin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation / J.W. Austin [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1998. – Vol. 162, N 2. – P. 295–301.
104. Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli* / P. Klemm [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 51, N 1. – P. 283–296.
105. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis* / F. Chu [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 2006. – Vol. 59, N 4. – P. 1216–1228.
106. A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function / M. Serrano [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181, N 12. – P. 3632–3643.
107. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation / D. Tielker [et al.] // *Microbiology.* – 2005. – Vol. 151, pt. 5. – P. 1313–1323.
108. An immunoproteomic approach for characterization of dormancy within *Staphylococcus epidermidis* biofilms / V. Carvalhais [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2015. – Vol. 65, N 2. – P. 429–435.
109. Simmons, W.L. Biofilms protect *Mycoplasma pulmonis* cells from lytic effects of complement and gramicidin / W.L. Simmons, K. Dybvig // *Infect. Immun.* – 2007. – Vol. 75, N 8. – P. 3696–3699.
110. Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing / S.A. Kristian [et al.] // *J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 197, N 7. – P. 1028–1035.
111. Оценка способности сывороток крови, иммуноглобулинов G пациентов с гнойно-воспалительными процессами и ряда ферментов к разрушению экзополисахаридного матрикса биопленок / В.К. Окулич [и др.] // *Хирургия. Восточ. Европа.* – 2014. – № 3. – С. 9–17.

112. Невинский, Г.А. Особенности абзимов из крови и молока здоровых доноров и пациентов с аутоиммунными и вирусными заболеваниями / Г.А. Невинский, В.Н. Бунева // Биохимия. – 2009. – Т. 74, № 9. – С. 1165–1183.
113. Антибактериальная терапия : практ. рук. / В.Г. Аковбян [и др.] ; под ред. Л.С. Страчунского. – М., 2000. – 190 с.
114. Гурин, Н.Г. Побочное действие лекарственных средств / Н.Г. Гурин // Мед. новости. – 1998. – № 2. – С. 19–20.
115. Яковлев, С.В. Клиническая химиотерапия бактериальных инфекций / С.В. Яковлев. – М. : НЬЮДИАМЕД, 1996. – 120 с.
116. Метод лечения гнойных ран мягких тканей, вызванных возбудителями, способными формировать биоплёнку : инструкция по применению № 076-0714 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 10.09.2014 г. / авт.-сост.: В.И. Петухов, В.К. Окулич, В.П. Булавкин, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников ; Витеб. гос. мед. ун-т. – Витебск : ВГМУ, 2014. – 10 с.
117. Bernard, P. Pristinamycin in the treatment of acute bacterial dermohypodermatitis in adults. An open study of 42 patients / P. Bernard, L. Risse, J.M. Bonnetblanc // Ann. Dermatol. Venereol. – 1996. – Vol. 123, N 1. – P. 16–20.
118. Blaser, M.J. The bacteria behind ulcers / M.J. Blaser // Sci. Am. – 1996. – Vol. 274, N 2. – P. 104–107.
119. Saxon, A. Investigations into the immunologic cross-reactivity of aztreonam with other beta-lactam antibiotics / A. Saxon, E.A. Swabb, N.F. Adkinson // Am. J. Med. – 1985. – Vol. 78, N 2A. – P. 19–26.
120. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – Смоленск, 2007. – 464 с.
121. Козлов, С.Н. Современная антимикробная химиотерапия : рук. для врачей / С.Н. Козлов, Л.С. Страчунский. – М., 2009. – 448 с.
122. Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance / К.О. Gualerzi [et al.]. – New York : Wiley, 2013. – 576 p.
123. Вильямс, Д. Резистентность к бета-лактамам препаратам / Д. Вильямс // Антибиотики и химиотерапия. – 1997. – Т. 42, № 10. – С. 5–9.
124. Козлов, Р.С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль / Р.С. Козлов // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 16–30.
125. Представление населения об антибиотиках: результаты телефонного опроса в 7 городах России / С.Н. Козлов [и др.] // Ремедиум. – 2003. – № 10. – С. 16–20.
126. Самостоятельное применение антимикробных препаратов населением: результаты многоцентрового исследования / Э.А. Ортенберг [и др.] // Клин. фармакология и терапия. – 2002. – Т. 11, № 2. – С. 25–29.
127. Tambic-Andrasevic, A. Antibiotic resistance-bacteria fight back / A. Tambic-Andrasevic // Acta. Med. Croatica. – 2004. – Vol. 58, N 4. – P. 245–250.

128. Сидоренко, С.В. Происхождение, эволюция и клиническое значение антибиотикорезистентности / С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Т. 44, № 12. – С. 19–22.
129. Шагинян, И.А. Молекулярная эпидемиология инфекций, вызываемых метициллинустойчивыми стафилококками / И.А. Шагинян, О.А. Дмитриенко // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2003. – № 3. – С. 99–109.
130. Хвещук, П.Ф. Оптимизация антибактериальной терапии в лечебно-профилактических учреждениях / П.Ф. Хвещук, А.В. Рудакова // Воен.-мед. журн. – 2000. – Т. 321, № 2. – С. 72–76.
131. Ушкалова, Е.А. Клиническое и экономическое значение рациональной антибиотикотерапии и методы улучшения использования антибиотиков / Е.А. Ушкалова // Фармация. – 2000. – № 2. – С. 33–35.
132. Титов, Л.П. Стратегии контроля резистентности микроорганизмов к антибиотикам: международный и национальный опыт / Л.П. Титов, В.И. Ключенович // Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам : материалы междунар. науч.-практ. конф. – Минск, 2003. – С. 4–13.
133. WHA58.27 Улучшение деятельности по сдерживанию резистентности к противомикробным препаратам [Электронный ресурс] : резолюция 58-й сес. Всемир. ассамблеи здравоохранения. – 2005. – Режим доступа: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21450ru/s21450ru.pdf>. – Дата доступа: 05.04.2016.
134. Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к антимикробным средствам [Электронный ресурс] / Всемир. орг. здравоохранения. – 2001. – Режим доступа: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO\\_CDS\\_CSR\\_DRS\\_2001.2a\\_rus.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.2a_rus.pdf). – Дата доступа: 05.04.2016.
135. Council Recommendation of 15 November 2001 on the prudent use of antimicrobial agents in human medicine (2002/77/EC) [Electronic resource] // Official Journal of the European Communities. – 2002. – Mode of access: [http://eurlex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2002/l\\_034/l\\_03420020205en00130016.pdf](http://eurlex.europa.eu/pri/en/oj/dat/2002/l_034/l_03420020205en00130016.pdf). – Date of access: 05.04.2016.
136. The bacterial challenge: time to react: a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents [Electronic resource] / European Centre for Disease Prevention and Control, European Medicines Agency. – 2009. – Mode of access: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909\\_TER\\_The\\_Bacterial\\_Challenge\\_Time\\_to\\_React.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf). – Date of access: 05.04.2016.
137. Innovative incentives for effective antibacterials [Electronic resource]. – 2009. – Mode of access: <https://lakemedelsverket.se/upload/nyheter/2009/Rapport%20fr%C3%A5n%20m%C3%B6tet.pdf>. – Date of access: 05.04.2016.

138. В Европе вдвое возросло число случаев устойчивости к карбапенемам [Электронный ресурс]. – Мед. вестн. – 2014. – 19 нояб. – Режим доступа: <http://www.medvestnik.by/ru/news/view/v-evrope-vdvoe-vozroslo-chislo-sluchaev-ustojchivosti-k-karbapenemam-3462-2014/>. – Дата доступа: 05.04.2016.
139. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Electronic resource] / World Health Organization. – 2014. – Mode of access: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1). – Date of access: 05.04.2016.
140. Gram-positive resistance: The Real Hot Zone [Electronic resource]. – 1995. – 1 electronic optical disk (CD-ROM).
141. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / В.А. Аковбян [и др.] ; под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М. : Объединен. ред. Боргес, 2002. – 380 с.
142. Семенов, В.М. Микробиологические и биологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам / В.М. Семенов, Т.И. Дмитраченко, И.В. Жильцов // Мед. новости – 2004. – № 2. – С. 10–17.
143. Shanahan, C.A. The bacterial second messenger c-di-GMP: probing interactions with protein and RNA binding partners using cyclic dinucleotide analogs / C.A. Shanahan, S.A. Strobel // Org. Biomol. Chem. – 2012. – Vol. 10, N 46. – P. 9113–9129.
144. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method / M. Shigeta [et al.] // Chemotherapy. – 1997. – Vol. 43, N 5. – P. 340–345.
145. Rodríguez-Martínez, J.M. Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / J.M. Rodríguez-Martínez, S. Ballesta, A. Pascual // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2007. – Vol. 30, N 4. – P. 366–368.
146. Anderl, J.N. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumonia* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin / J.N. Anderl, M.J. Franklin, P.S. Stewart // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2000. – Vol. 44, N 7. – P. 1818–1824.
147. Kirker, K.R. Potency and penetration of telavancin in staphylococcal biofilms / K.R. Kirker, S.T. Fisher, G.A. James // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2015. – Vol. 46, N 4. – P. 451–455.
148. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences / R. Singh [et al.] // Pathog. Dis. – 2016. – Vol. 74, N 6.
149. Activity and penetration of linezolid and vancomycin against *Staphylococcus epidermidis* biofilms / J.M. Rodríguez-Martínez [et al.] // Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. – 2007. – Vol. 25, N 7. – P. 425–428.
150. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / M. Whiteley [et al.] // Nature. – 2001. – Vol. 413, N 6858. – P. 860–864.

151. Massey, R.C. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus* / R.C. Massey, A. Buckling, S.J. Peacock // *Curr. Biol.* – 2001. – Vol. 11, N 23. – P. 1810–1814.
152. Lewis, K. Riddle of biofilm resistance / K. Lewis // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45, N 4. – P. 999–1007.
153. Zambrano, M.M. GASping for life in stationary phase / M.M. Zambrano, R. Kolter // *Cell.* – 1996. – Vol. 86, N 2. – P. 181–184.
154. Smith, R.S. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence / R.S. Smith, B.H. Iglewski // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 6, N 1. – P. 56–60.
155. Camargo, G.M. Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy / G.M. Camargo, A.C. Pizzolitto, E.L. Pizzolitto // *Int. J. Gynecol. Obstet.* – 2005. – Vol. 90, N 2. – P. 148–149.
156. Kadurugamuwa, J.L. Bioluminescent imaging of bacterial biofilm infections in vivo / J.L. Kadurugamuwa, K.P. Francis // *Methods Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 431. – P. 225–239.
157. Гостев, В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // *Журн. инфектологии.* – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 4–15.
158. Fluorescence «in situ» hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa / L. Nistico [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 493. – P. 191–213.
159. Пронина, Е.А. Формирование бактериальных биопленок под воздействием электромагнитного излучения / Е.А. Пронина, И.Г. Швиденко, Г.М. Шуб // *Фундам. исслед.* – 2010. – № 10. – С. 40–45.
160. Henrici, A.T. Studies off reshwater bacteria: I. A direct microscopic technique / A.T. Henrici // *J. Bacteriol.* – 1933. – Vol. 25, N 3. – P. 277–287.
161. Costerton, J.W. How bacteria stick / J.W. Costerton, G.G. Geesey, K.J. Cheng // *Sci. Am.* – 1978. – Vol. 238, N 1. – P. 86–95.
162. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices / G.D. Christensen [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1985. – Vol. 22, N 6. – P. 996–1006.
163. Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci / S. Stepanovic [et al.] // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 20, N 7. – P. 502–504.
164. Şeker, Ş. The effects of biofilm thickness on biofilm density and substrate consumption rate in a differential fluidized bed biofilm reactor (DFBBR) / Ş. Şeker, H. Beyenal, A. Tanyolaç // *J. Biotech.* – 1995. – Vol. 41, N 1. – P. 39–47.
165. Montville, R. Inoculum size influences bacterial cross contamination between surfaces / R. Montville, D.W. Schaffner // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, N 12. – P. 7188–7193.
166. Coenye, T. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation / T. Coenye, H.J. Nelis // *J. Microbiol. Methods.* – 2010. – Vol. 83, N 2. – P. 89–105.

167. Establishment of experimental biofilms using the modified robbins device and flow cells / L. Hall-Stoodley [et al.] // *Methods Biotechn.* – 1999. – Vol. 12. – P. 307–319.
168. Jakobsen, T.H. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition in vitro. Quorum sensing: methods and protocols / T.H. Jakobsen [et al.] // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 692. – P. 253–263.
169. Лямин, А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы / А.В. Лямин, Е.А. Боткин, А.В. Жестков // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия.* – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 17–22.
170. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface / M. Vergara-Irigaray [et al.] // *Microbiology.* – 2008. – Vol. 154, pt. 3. – P. 865–877.
171. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии / Н.В. Серегина [и др.] // *Вестн. новых мед. технологий.* – 2008. – Т. 15, № 4. – С. 175–177.
172. Berry, R.E. Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli* / R.E. Berry, D.J. Klumpp, A.J. Schaeffer // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 77, N 7. – P. 2762–2772.
173. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa / M.M. Harriott [et al.] // *Microbiology.* – 2010. – Vol. 156, pt. 12. – P. 3635–3644.
174. Simmons, W.L. Mycoplasma biofilms ex vivo and in vivo / W.L. Simmons, K.Dybvig // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – Vol. 295, N 1. – P. 77–81.
175. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window / R.D. Wolcott [et al.] // *J. Wound. Care.* – 2010. – Vol. 19, N 8. – P. 320–328.
176. Elevated incidence of dental caries in a mouse model of cystic fibrosis / M.A. Catalan [et al.] // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, N 1. – P. e16549.
177. Role of *Porphyromonas gingivalis* phosphoserine phosphatase enzyme SerB in inflammation, immune response, and induction of alveolar bone resorption in rats / B. Bainbridge [et al.] // *Infect. Immun.* – 2010. – Vol. 78, N 11. – P. 4560–4569.
178. Merritt, J.H. Growing and analyzing static biofilms / J.H. Merritt, D.E. Kadouri, G.A. O'Toole // *Cur. Protoc. Microbiol.* – 2005. – Chapt. 1. – P. unit 1B.
179. Методы общей бактериологии : руководство. В 3 т. Т. 2 / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М. : Мир, 1984. – 472 с.
180. *Manual of Clinical Microbiology* / A. Balows [et al.]. – 5th ed. – Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1991. – 1364 p.
181. Адарченко, А.А. Внутрибольничные инфекции / А.А. Адарченко // *Здравоохранение.* – 1997. – № 6. – С. 45–48.
182. Федянин, С.Д. Общие правила и техника забора материала для бактериологических исследований : метод. рекомендации / С.Д. Федянин, В.К. Окулич, В.П. Булавкин. – Витебск, 2009. – 35 с.

183. Устройство для выращивания биопленки : пат. 8420 Респ. Беларусь : МПК С 12 М 1/00 / Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. ; заявитель и патентообладатель Витеб. гос. мед. ун-т. – № 20111059 ; заявл. 26.12.11 ; опубл. 30.08.12, Бюл. № 4. – С. 208.
184. Способ оценки способности образования биопленки микроорганизмами : пат. 17673 Респ. Беларусь : МПК С 12 Q 1/02, G 01 N 33/487 / Кабанова А.А., Окулич В.К., Плотникова Ф.В. ; заявитель и патентообладатель Витеб. гос. мед. ун-т. – № 20110572 ; заявл. 04.05.11 ; опубл. 30.10.13, Бюл. № 5. – С. 109–110.
185. Методы общей бактериологии : руководство. В 3 т. Т. 3 / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М. : Мир, 1984. – 264 с.
186. Основы клинической микробиологии и иммунологии : учеб. метод пособие : в 2 ч. / под ред. А.П. Красильникова. – Минск, 1989. – Ч. 1 : Основы клинической микробиологии. – 61 с.
187. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М.О. Биргера. – М. : Медицина, 1982. – 464 с.
188. Практические аспекты современной клинической микробиологии / Л.З. Скала [и др.] – М. : Лабинформ, 1997. – 181 с.
189. Методы исследования в микробиологии : учеб.-метод. пособие / Ж. Г. Шабан [и др.]. – Минск : БГМУ, 2010. – 124 с.
190. Визуализация биоплёнок с помощью световой микроскопии / Ф.В. Плотников, А.А. Кабанова, Н.Ю. Богдан // Студенческая медицинская наука XXI века : материалы XI междунар. науч.-практ. конф., 3–4 нояб. 2011 г. – Витебск : ВГМУ, 2011. – С. 203–204.
191. Визуализация биоплёнок с помощью конфокальной и световой микроскопии / Ф.В. Плотников [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. – Минск : РНМБ, 2011. – Вып. 4. – С. 183–186.
192. Комплексный подход к изучению биопленок микроорганизмов методом атомно-силовой микроскопии / П.С. Ерохин [и др.] // Изв. Сарат. ун-та. Новая сер. Сер. Физика. – 2012. – Т. 12, № 1. – С. 42–46.
193. Морозова, К.Н. Электронная микроскопия в цитологических исследованиях : метод. пособие / К.Н. Морозова. – Новосибирск : Новосиб. гос. ун-т, 2013. – 85 с.
194. Очеретина, Р.Ю. / Стереоультраструктурное исследование биопленок бактерий воспалительного очага пациентов с хроническим остеомиелитом / Р.Ю. Очеретина, З.С. Наumenко // Междунар. журн. приклад. и фундам. исслед. – 2015. – № 12-4. – С. 650–652.
195. Визуализация клеточного полимерного матрикса биопленок *Chromobacterium violaceum* с помощью микроскопических методов /М. В. Журина [и др.] // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 4. – С.502-509.
196. Потатуркина-Нестерова, Н.И. Атомно-силовая микроскопия как метод исследования в микробиологии / Н.И. Потатуркина-Нестерова, И.С. Немова, А.В. Даньшина // Современ. проблемы науки и образования. –



2012. – № 3. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=6348>. – Дата доступа: 05.04.2016.
197. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci / S. Stepanović [et al.] // APMIS. – 2007. – Vol. 115, N 8. – P. 891–899.
198. Kalendar, R. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis / R. Kalendar, D. Lee, A.H. Schulman // Genomics. – 2011. – Vol. 98, N 2. – P. 137–144.
199. von Ahsen, N. Oligonucleotide melting temperatures under pcr conditions: nearest-neighbor corrections for  $Mg^{2+}$ , deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas / N. von Ahsen, C.T. Wittwer, E. Schütz // Clin. Chem. – 2001. – Vol. 47, N 11. – P. 1956–1961.
200. Шилова, Н.В. Интерфазная флуоресцентная гибридизация in situ в диагностике числовых хромосомных aberrаций / Н.В. Шилова, Т.В. Золотухина // Мед. генетика. – 2007. – Т. 6, № 10. – С. 53–58.
201. Bridge, J.A. Molecular diagnostics of soft tissue tumors / J.A. Bridge, A.M. Cushman-Vokoun // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2011. – Vol. 135, N 5. – P. 588–601.
202. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) / S.S. Atshan [at al.] // Infect. Genet. Evol. – 2013. – Vol. 18. – P. 106–112.
203. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник / под ред. А.А. Воробьева. – М. : МИА, 2004. – 690 с.
204. Чеботарь, И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета / И.В. Чеботарь // Вестн. Рос. акад. мед. наук. – 2012. – Т. 67, № 12. – С. 22–29.
205. Характеристика антимикробной активности препарата «Ягель» при воспалительном процессе краевой десны / А.С. Черемкина [и др.] // Якут. мед. журн. – 2015. – № 4. – С. 33–35.
206. Разработка способа модификации микрофилтрационных полиамидных мембран в целях придания им бактерицидных свойств / А.В. Тарасов [и др.] // Вопр. современ. науки и практики. Ун-т им. В.И. Вернадского. – 2013. – № 3. – С. 237–244.
207. Руководство к практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие / под ред. Н.С. Егорова. – М. : Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.
208. Определение количества колоний образующих единиц бактерий-возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний, способных формировать биопленку / А.А. Кабанова [и др.] // Современные достижения стоматологии и челюстно-лицевой хирургии : тр. всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Киров, 2014. – С. 116–120.
209. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Terminology // Clin. Microbiol. Infect. – 1998. – Vol. 4, N 5. – P. 291–296.

210. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. / М.В. Сухорукова [и др.] // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 4. – С. 254–265.
211. Принципы организации мониторинга устойчивости ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к антимикробным препаратам в лечебно-профилактических медицинских организациях здравоохранения : федерал. клин. рекомендации / Л.А. Кафтырева [и др.]. – М., 2014. – 37 с.
212. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline : M44-A / CLSI. – Wayne, PA : CLSI, 2004. – 26 p.
213. Микробиология, вирусология и иммунология : рук. к лаборатор. занятиям : учеб. пособие / под ред. В.Б. Сбойчакова, М.М. Карапаца. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 320с.
214. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам : метод. указания. – М., 2004. – 91 с.
215. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии. В 2 ч. Ч. 1 / О.В. Прунтова, О.Н. Сахно, М.А. Мазиров. – Владимир : Изд-во Владим. гос. ун-та, 2006. – 192 с.
216. Сравнение минимальной подавляющей концентрации антибиотиков для планктонных форм бактерий и бактерий в составе биопленки / А.А. Кабанова [и др.] // Интегративная медицина в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии : сб. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Паринские чтения 2014» (Минск, 10–11 апр., 2014 г.). – Минск : Издат. центр БГУ, 2014. – С. 292–294.
217. Поляк, М.С. Лабораторное обеспечение антибиотикотерапии / М.С. Поляк. – СПб. : Анатолия, 2012. – 256 с.
218. Ускоренные и экспресс-методы определения чувствительности-устойчивости микроорганизмов к антибиотикам / Е.И. Гудкова [и др.] // Мед. журн. – 2006. – № 3. – С. 114–116.
219. The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing / H. Ceri [et al.] // Methods Enzymol. – 2001. – Vol. 337. – P. 377–385.
220. Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents / D. Davies // Nat. Rev. Drug. Discov. – 2003. – Vol. 2, N 2. – P. 114–122.
221. Survival strategies of infectious biofilms / C.A. Fux [et al.] // Trends Microbiol. – 2005. – Vol. 13, 1. – P. 34–40.
222. Lewis, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells / K. Lewis // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2008. – Vol. 322. – P. 107–131.
223. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Hoiby [et al.] // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010. – Vol. 35, N 4. – P. 322–332.
224. Изменение антибиотикочувствительности стафилококков в условиях реализации эффекта пептидного антибактериального фактора / В.П.

- Коробов [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2002. – Т. 47, № 2. – С. 11–15.
225. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation / B. Vu [et al.] // *Molecules*. – 2009. – Vol. 14, N 7. – P. 2535–2554.
226. Nitrate-responsive NarX–NarL represses arginine-mediated induction of the *Pseudomonas aeruginosa* arginine fermentation arcDABC operon / B. Benkert [et al.] // *Microbiology*. – 2008. – Vol. 154, pt. 10. – P. 3053–3060.
227. Фадеев, С.Б. Изменение способности формировать биоплёнки госпитальными метициллинорезистентными штаммами *Staphylococcus aureus* под действием антибиотиков / С.Б. Фадеев // Раны и раневые инфекции с конференцией: проблемы анестезии и интенсивной терапии раневых инфекций : материалы 2-го междунар. конгр., Москва, 14–17 окт. 2014 г. – М., 2014. – С. 369–371.
228. Mapping the speciation of iron in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using scanning transmission X-ray microscopy / R.C. Hunter [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – Vol. 42, N 23. – P. 8766–8772.
229. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways / D.J. Hassett [et al.] // *Trends. Microbiol.* – 2009. – Vol. 17, N 3. – P. 130–138.
230. Bacterial Resistance to Antimicrobials: Mechanisms, Genetics, Medical Practice and Public Health / L. Jian [et al.] // *Biot. Let.* – 2002. – Vol. 24, N 10. – P. 801–805.
231. Lewis, K. Riddle of Biofilm Resistance / K. Lewis // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2001. – Vol. 45, N 4. – P. 999–1007.
232. Effect of ambroxol on pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an endotracheal intubation rat model / F. Li [et al.] // *Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 57, N 2. – P. 173–180.
233. Ambroxol interferes with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing / Q. Lu [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2010. – Vol. 36, N 3. – P. 211–215.
234. Авдеев, С.Н. Значение мукоактивных препаратов в терапии хронической обструктивной болезни легких / С.Н. Авдеев // Пульмонология. – 2011. – № 4. – С. 118–124.
235. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces / I. Raad [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47, N 11. – P. 3580–3585.
236. Contribution of autolysin and Sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development / P.S. Guiton [et al.] // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. 77, N 9. – P. 3626–3638.
237. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms / E.A. Izano [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 74, N 2. – P. 470–476.
238. Miller, M. Quorum sensing in bacteria / M. Miller, B. Bassler // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 165–199.

239. Effect of pulsed ultrasound in combination with gentamicin on bacterial viability in biofilms on bone cements in vivo / G.T. Ensing [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2005. – Vol. 99, N 3. – P. 443–448.
240. The viability of planktonic and biofilm bacteria: an in vitro study with clinical strains / G.T. Ensing [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – Vol. 58, N 6. – P. 1287–1290.
241. Treatment of Biofilm Infections on Implants with Low-frequency Ultrasound and Antibiotics / J. C. Carmen [et al.] // Am. J. Infect. Control. – 2005. – Vol. 33, N 2. – P. 78–82.
242. Fey, P.D. Modality of bacterial growth presents unique targets: How do we treat biofilm-mediated infections? / P.D. Fey // Curr. Opin. Microbiol. – 2010. – Vol. 13, N 5. – P. 610–615.
243. Yamanaka, M. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis / M. Yamanaka, K. Hara, J. Kudo // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, N 11. – P. 7589–7593.
244. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* / K. Kalishwaralal [et al.] // Colloids Surf. Biointerfaces. – 2010. – Vol. 79, N 2. – P. 340–344.
245. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants / K.D. Secinti [et al.] // J. Clin. Neurosci. – 2011. – Vol. 18, N 3. – P. 391–395.
246. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients / A. Pompilio [et al.] // Peptides. – 2011. – Vol. 32, N 9. – P. 1807–1814.
247. Kharidia, R. The activity of a small lytic peptide PTP-7 on *Staphylococcus aureus* biofilms / R. Kharidia, J.F. Liang // J. Microbiol. – 2011. – Vol. 49, N 4. – P. 663–668.
248. Кокряков, В.Н. Очерки о врождённом иммунитете / В.Н. Кокряков. – СПб. : Наука, 2006. – 261 с.
249. Synthetic analogues of antimicrobial peptides from venom / A.A. Vasilevskii [et al.] // Bioorg. Khim. – 2007. – Vol. 33, N 4. – P. 405–412.
250. Jenssen, H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R.E. Hancock // Clin. Microbiol. Rev. – 2006. – Vol. 19, N 3. – P. 491–511.
251. Yamasaki, K. Antimicrobial peptides in human skin disease / K. Yamasaki, R.L. Gallo // Eur. J. Dermatol. – 2008. – Vol. 18, N 1. – P. 11–21.
252. Effects of chicken intestinal antimicrobial peptides on humoral immunity of chickens and antibody titres after vaccination with infectious bursal disease virus vaccine in chicken / Y. Yurong [et al.] // Arch. Anim. Nutr. – 2006. – Vol. 60, N 5. – P. 427–435.
253. Сипайлова, О.Ю. Антимикробные низкомолекулярные пептиды: факторы неспецифической защиты организма животных / О.Ю. Сипайлова, Д.В. Нестеров // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. – 2013. – № 12. – С. 169–172.

254. Persister Cells and the Mechanism of Multidrug Tolerance in *Escherichia coli* / I. Keren [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186, N 24. – P. 8172–8180.
255. Влияние антимикробных пептидов из тромбоцитов сельскохозяйственных животных на способность микроорганизмов к образованию биопленок / М.В. Сычёва [и др.] // *Вестн. КрасГАУ.* – 2011. – № 1. – С. 130–132.
256. Журлов, О.С. Влияние антимикробных пептидов тромбоцитарного лизата (Hpl) на физико-химические свойства и кинетику роста биопленкообразующих коагулазоотрицательных стафилококков / О.С. Журлов // *Успехи современ. естествознания.* – 2015. – № 9, ч. 1. – С. 107–109.
257. Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm / M. Dawgul [et al.] // *Acta Pol. Pharm.* – 2014. – Vol. 71, N 1. – P. 39–47.
258. Sillankorva, S. Use of Bacteriophages to Control Biofilms : Dissertation thesis for the PhD degree in Chemical and Biological Engineering / S. Sillankorva. – Braga : Minho Univ., 2008. – 199 p.
259. Abedon, S.T. Phage therapy pharmacology / S.T. Abedon, C. Thomas-Abedon // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 11, N 1. – P. 28–47.
260. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme / J.S. Son [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 86, N 5. – P. 1439–1449.
261. Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential / D. Gutiérrez [et al.] // *BMC Genomics.* – 2012. – Vol. 13. – P. 228–317.
262. Yan, J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications / J. Yan, J. Mao, J. Xie // *BioDrugs.* – 2014. – Vol. 28, N 3. – P. 265–274.
263. An in vitro model of bacterial infections in wounds and other soft tissues / M. Werthén [et al.] // *APMIS.* – 2010. – Vol. 118, N 2. – P. 156–164.
264. Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis* / X. Meng [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 77, N 23. – P. 8272–8279.
265. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system / W. Fu [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54, N 1. – P. 397–404.
266. Azeredo, J. The use of phages for the removal of infectious biofilms / J. Azeredo, I.W. Sutherland // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 9, N 4. – P. 261–266.
267. Carson, L. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* / L. Carson, S.P. Gorman, B.F. Gilmore // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 59, N 3. – P. 447–455.

268. Curtin, J.J. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis* / J.J. Curtin, R.M. Donlan // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2006. – Vol. 50, N 4. – P. 1268–1275.
269. Вакарева, М.М. Влияние полидиметилдиаллиламмония йодида сахарозы на выживаемость коагулазоположительных стафилококков / М.М. Вакарева, О.В. Нечаева, Д.А. Заярский // *Экологические проблемы промышленных городов : сб. науч. тр. по материалам 6-й всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием.* – Саратов, 2013. – Ч. 2. – С. 40–42.
270. Inhibitors and Antagonists of Bacterial Quorum Sensing / N. Ni [et al.] // *Med. Res. Rev.* – 2009. – Vol. 29, N 1. – P. 65–124.
271. The plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*: a model to study the roles of lactonases in the quorum Sensing regulatory network / C. d'Angelo-Picard [et al.] // *Biol. Plant-Microbe Interact.* – 2006. – Vol. 5. – P. 353–356.
272. Antibody catalyzed hydrolysis of a quorum sensing signal found in Gram-negative bacteria / S. De Lamo Marin [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – Vol. 17, N 6. – P. 1549–1552.
273. Furanones, potential agents for preventing *Staphylococcus epidermidis* biofilm infections? / J. Lonn-Stensrud [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2009. – Vol. 63, N 2. – P. 309–316.
274. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP / N. Balaban [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – Vol. 51, N 6. – P. 2226–2229.
275. Quorum Sensing Inhibitors Increase the Susceptibility of Bacterial Biofilms to Antibiotics In Vitro and In Vivo / G. Brackman [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55, N 6. – P. 2655–2661.
276. Siamycin Attenuates *fsr* Quorum Sensing Mediated by a Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone in *Enterococcus faecalis* / J. Nakayama [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2007. – Vol. 189, N 4. – P. 1358–1365.
277. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation / C.T. O'Loughlin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110, N 44. – P. 17981–17986.
278. Conway, B.A. Biofilm formation and acyl-homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex / B.A. Conway, V. Venu, D. Speert // *Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184, N 20. – P. 5678–5685.
279. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl-homoserine lactonase / Y. Dong [et al.] // *Nature.* – 2001. – Vol. 411, N 6839. – P. 813–817.
280. Mohamed, J.A. Biofilm formation by enterococci / J.A. Mohamed, D.B. Huang // *J. Med. Microbiol.* – 2007. – Vol. 56, pt. 12. – P. 1581–1588.
281. Экспериментальное исследование антибактериальной активности наночастиц серебра на модели перитонита и менингоэнцефалита *in vivo* [Электронный ресурс] / Е.И. Савин [и др.] // *Вестн. новых мед. технологий. Электрон. изд.* – 2014. – № 1. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/v/eksperimentalnoe-issledovanie-antibakterialnoy->

aktivnosti-nanochastits-serebra-na-modeli-peritonita-i-meningoentsefalita-in-vivo. – Дата доступа: 05.04.2016.

282. Мосин, О. В. Бактерицидные свойства наночастиц коллоидного серебра / О.В. Мосин // Нанотехнологии. Экология. Производство. – 2013. – № 6. – С. 54–59.

283. Гладких, П.Г. Эффект наночастиц серебра в отношении биопленок микроорганизмов / П.Г. Гладких // Вестн. новых мед. технологий. Электрон. изд. – 2015. – Т. 9, № 1. – Режим доступа: <http://cyberleninka.ru/article/n/effekt-nanochastits-serebra-v-otnoshenii-bioplenuk-mikroorganizmov-literaturnyy-obzor>. – Дата доступа: 05.04.2016.

284. Биосовместимые композиционные покрытия для защиты имплантатов от микробных биопленок / Д.В. Тапальский [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2013. – № 2. – С. 129–134.

285. In vitro assessment of bacterial adhesion to Hydromer coated cerebrospinal fluid shunts / M.J. Bridgett [et al.] // Biomaterials. – 1993. – Vol. 14, N 3. – P. 184–188.

286. Kristinsson, K.G. Adherence of staphylococci to intravascular catheters / K.G. Kristinsson // J. Med. Microbiol. – 1989. – Vol. 28, N 4. – P. 249–257.

287. Kramer, A. Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified controlled, parallelgroup study / A. Kramer, B. Roth, G. Müller // Skin. Pharmacol. Physiol. – 2004. – Vol. 17, N 3. – P. 141–146.

288. Пируева, Т.А. Оценка антисептического воздействия на возбудителей хирургических инфекций в составе биопленок / Т.А. Пируева, О.В. Карабаева // Всероссийская Итоговая 74-я студенческая научная конференция им. Н.И. Пирогова (Томск, 27-29 апреля 2015 г.) : сб. материалов. – Томск, 2015. – С. 97–98.

289. Biofilm–control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study / J.B. Xavier [et al.] // Microbiology. – 2005. – Vol. 151, pt. 12. – P. 3817–3832.

290. ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* / D. Qiu [et al.] // Microbiology. – 2008. – Vol. 154, pt. 7. – P. 2119–2130.

291. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology / A.P. Tomaras [et al.] // Microbiology. – 2008. – Vol. 154, pt. 11. – P. 3398–3409.

292. Pace, J.L. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy / J.L. Pace, M.E. Rupp, R.G. Finch. – Boca Raton, FL : CRC Press : Taylor & Francis Group, 2006. – 512 p.

293. Оценка способности иммуноглобулинов пациентов с хирургической инфекцией к разрушению экзополисахаридного матрикса биопленок / Ф.В. Плотников [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. – Минск : ГУ РНМБ, 2012. – Вып. 5. – С. 294–297.

294. Наконечник к ультразвуковому хирургическому аппарату «ЛОРА-

- Дон» для разрушения матрикса биопленки : пат. 9652 МПК С 12 N 13/00 (21) / Окулич В.К., Куницкий В.С., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. ; заявитель и патентообладатель Витеб. гос. мед. ун-т. – № 20130288 ; заявл. 04.04.13 ; опубл. 30.10.13, Бюл. № 5. – С. 201.
295. Наконечник к ультразвуковому хирургическому аппарату «ЛОРА-Дон» для разрушения матрикса биопленки : пат. 10021 Респ. Беларусь : МПК С 12 N 13/00 / Окулич В.К., Куницкий В.С., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. ; заявитель и патентообладатель Витеб. гос. мед. ун-т. – № 20130737 ; заявл. 13.09.13 ; опубл. 30.04.14, Бюл. № 2. – С. 146–147.
296. Contribution of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin / M. C. Walters [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47, N 1. – P. 317–323.
297. Способ определения способности биопленки снижать проникновение антибиотиков: (51) МПК С12N1/20 (2006.01) С12Q 1/02 (2006.01) (21) а20111395 (22) 2011.10.24 (71) Учреждение образования «Витебский государственный медицинский университет» (ВУ) / В.К. Окулич, А.А. Кабанова, Ф.В. Плотников. – № 18949. Заявл.24.10.2011 // Афіцыйны бюлетэнь. Вынаходства, карысныя мадэлі, прамысловыя ўзоры. – 2015. – № 1 (102) – С.80-81.
298. Плотников, Ф.В. Эффективность антисептиков в отношении матрикса микробных биоплёнок // Ф.В. Плотников, А.А. Кабанова // Студенческая медицинская наука XXI века : материалы XIII междунар. науч.-практ. конф., 14–15 нояб. 2013 г. – Витебск, 2013. – С. 222–223.
299. Оценка способности сывороток крови, иммуноглобулинов G пациентов с гнойно-воспалительными процессами и ряда ферментов к разрушению экзополисахаридного матрикса биопленок / В.К. Окулич [и др.] // *Хирургия. Восточ. Европа.* – 2014. – № 3. – С. 9–17.
300. Резистентность к антибиотикам госпитальных изолятов золотистого стафилококка, образующих биоплёнку / В.К. Окулич [и др.] // *Здравоохранение.* – 2015. – № 7. – С. 11–16.
301. Чувствительность *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и её связь с биоплёнкообразованием / Ф.В. Плотников [и др.] // Актуальные вопросы современной медицины и фармации : материалы 64-й итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, 17–18 апр. 2012 г. – Витебск, 2012. – С. 366–367.
302. Сравнение минимальной подавляющей концентрации антибиотиков для планктонных форм бактерий и бактерий в составе биопленки / А.А. Кабанова [и др.] // Интегративная медицина в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии : сб. тр. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Паринские чтения 2014» (Минск, 10–11 апр. 2014 г.). – Минск : Издат. центр БГУ, 2014. – С. 292–294.
303. Biofilms as complex differentiated communities / P. Stoodley [et al.] // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2002. – Vol. 56. – P. 187–209.



304. Bacterial biofilms in nature and disease / J.W. Costerton [et al.] // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1987. – Vol. 41. – P. 435–464.
305. Blango, M.G. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics / M.G. Blango, M.A. Mulvey // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54, N 5. – P. 1855–1863.
306. Parsek, M.R. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis / M.R. Parsek, P.K. Singh // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 57. – P. 677–701.
307. Role of Extracellular DNA in Initial Bacterial Adhesion and Surface Aggregation / T. Das [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – Vol. 76, N 10. – P. 3405–3408.
308. Gotz, F. Staphylococcus and biofilms / F. Gotz // *Mol. Microb.* – 2002. – Vol. 43, N 6. – P. 1367–1378.
309. Darouiche, R.O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence / R.O. Darouiche // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 33, N 9. – P. 1567–1572.
310. Мельников, В.Г. Поверхностные структуры грампозитивных бактерий в межклеточном взаимодействии и плёнокообразовании / В.Г. Мельников // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2010. – № 2. – С. 119–123.
311. Marsh, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm / P.D. Marsh // *Caries Res.* – 2004. – Vol. 38, N 3. – P. 204–211.
312. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults / B.J. Keijser [et al.] // *J. Dent. Res.* – 2008. – Vol. 87, N 11. – P. 1016–1020.
313. Madianos, P.N. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingival / P.N. Madianos, Y.A. Bobetsis, D.F. Kinane // *J. Clin. Periodontol.* – 2005. – Vol. 32, suppl. 6. – P. 57–71.
314. Takahashi, N. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process // N. Takahashi, B. Nyvad // *Caries Res.* – 2008. – Vol. 42, N 6. – P. 409–418.
315. Periodontitis: an archetypical biofilm disease / C. Schaudinn [et al.] // *J. Am. Dent. Assoc.* – 2009. – Vol. 140, N 8. – P. 978–986.
316. Distel, J.W. Biofilm formation in medicated root canals / J.W. Distel, J.F. Hatton, M.J. Gillespie // *J. Endod.* – 2002. – Vol. 28, N 10. – P. 689–693.
317. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after «one-visit» endodontic treatment / P.N. Nair [et al.] // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* – 2005. – Vol. 99, N 2. – P. 231–252.
318. Ricucci, D. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings / D. Ricucci, J.F.Jr. Siqueira // *J. Endod.* – 2010. – Vol. 36, N 8. – P. 1277–1288.
319. Побожьева, Л.В. Роль биопленки в патогенезе воспалительных заболеваний полости рта и способы ее устранения / Л.В. Побожьева, И.С. Копецкий // *Лечеб. дело.* – 2012. – № 2. – С. 9–13.

320. Синин, А.С. Лечение периимплантита / А.С. Синин, А.В. Погорелов, Б.П. Мельник // Бюл. мед. Интернет-конф. – 2014. – Т. 4. № 12. – С. 1375–1376.
321. Biofilm-Forming Capacity on Clinically Isolated Streptococcus constellatus from an Odontogenic Subperiosteal Abscess Lesion / T. Yamanaka [et al.] // J. Bacteriol. Parasitol. – 2013. – Vol. 4. – P. 160.
322. Potential role of biofilms in deep cervical abscess / J.G. May [et al.] // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. – 2014. – Vol. 78, N 1. – P. 10–13.
323. Dong, Y. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl-homoserine lactonase / Y. Dong, L. Wang, J. Xu // Nature. – 2001. – Vol. 411, N 6839. – P. 813–817.
324. Ильина, Т.С. Биоплёнки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 11. – С. 1445–1456.
325. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3. – С. 119–125.
326. Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // Cell Microbiol. – 2009. – Vol. 11, N 7. – P. 1034–1043.
327. Mashburn-Warren, L.M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes / L.M. Mashburn-Warren, M. Whiteley // Mol. Microbiol. – 2006. – Vol. 61, N 4. – P. 839–846.
328. Бережанский, Б.В. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока / Б.В. Бережанский, А.А. Жевнарев // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 130–144.
329. Orsi, G.B. Hospital-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infection: increased hospital stay and direct costs / G.B. Orsi, L. Di Stefano, N. Noah // Infect. Control Hosp. Epidemiol. – 2002. – Vol. 23, N 4. – P. 190–197.
330. Rogers, K.L. Coagulase-negative staphylococcal infections / K.L. Rogers, P.D. Fey, M.E. Rupp // Infect. Dis. Clin. North. Am. – 2009. – Vol. 23, N 1. – P. 73–98.
331. Вакараева, М.М. Действие полиаэзолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, на условно-патогенные микроорганизмы и образование биопленок : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03, 03.01.06 / М.М. Вакараева. – Оболенск, 2015. – 21 с.
332. Zimmerli, W. Infection and musculoskeletal conditions: Prosthetic-joint-associated infections / W. Zimmerli // Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. – 2006. – Vol. 20, N 6. – P. 1045–1063.
333. Способность к формированию биопленок у клинических штаммов S.aureus и S.epidermidis – ведущих возбудителей ортопедической имплант-ассоциированной инфекции / С.А. Божкова [и др.] // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 2. – С. 149–156.

334. Success through diversity – how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen / S.M. Schoenfelder [et al.] // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 300, N 6. – P. 380–386.
335. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen / W. Ziebuhr [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2006. – Vol. 28, suppl. 1. – P. S14–S20.
336. Pathogenesis of chronic bacterial prostatitis in an animal model / J.C. Nickel [et al.] // *Br. J. Urol.* – 1990. – Vol. 66, N 1. – P. 47–54.
337. Nickel, J.C. Coagulase-negative staphylococcus in chronic prostatitis / J.C. Nickel, J.W. Costerton // *J. Urol.* – 1992. – Vol. 147, N 2. – P. 398–400.
338. Domingue, G.J. Sr. Prostatitis / G.J. Sr. Domingue, W.J. Hellstrom // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1998. – Vol. 11, N 4. – P. 604–613.
339. Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of urinary tract infections / J.C. Nickel [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1994. – Vol. 33, suppl. A. – P. 31–41.
340. Nickel, J.C. Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis / J.C. Nickel, J.W. Costerton // *Prostate.* – 1993. – Vol. 23, N 2. – P. 107–114.
341. Мокиенко, А.В. Биопленки и инфекции: к оценке взаимосвязи / А.В. Мокиенко, В.А. Пушкина, А.И. Гоженко // *Наук. журн. МОЗ України.* – 2014. – № 1. – 129–136.
342. Choong, S. Biofilms and their role in infections in urology / S. Choong, H. Whitfield // *BJU Int.* – 2000. – Vol. 86, N 8. – P. 935–941.
343. Микрофлора почечных камней при мочекаменной болезни и поиск средств борьбы с биопленками уропатогенных бактерий / Э.Р. Толордава [и др.] // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2012. – № 4. – С. 56–62.
344. The role of biofilm infection in urology / P. Tenke [et al.] // *World J. Urol.* – 2006. – Vol. 24, N 1. – P. 13–20.
345. Лагун, Л.В. Интенсивность образования микробных биопленок микроорганизмами, выделенными при пиелонефрите и мочекаменной болезни / Л.В. Лагун, Д.В. Тапальский, С.В. Жаворонок // *Мед. журн.* – 2012. – № 4. – С. 64–67.
346. Warren, J.W. Catheter-associated urinary tract infections / J.W. Warren // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2001. – Vol. 17, N 4. – P. 299–303.
347. Microbial adhesion and biofilm formation on ureteral stents in vitro and in vivo / G. Reid [et al.] // *J. Urol.* – 1992. – Vol. 148, N 5. – P. 1592–1594.
348. Bacteriuria and colonization of double-pigtail ureteral stents: longterm experience with 237 patients / H.M. Farsi [et al.] // *J. Endourol.* – 1995. – Vol. 9, N 6. – P. 469–472.
349. Перепанова, Т.С. Значение инфекций, обусловленных образованием биопленок, в урологической практике / Т.С. Перепанова // *Эффектив. фармакотерапия. Урология и нефрология.* – 2013. – № 4. – С. 18–27.
350. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* / R.M. Stark [et al.] // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1999. – Vol. 28, N 2. – P. 121–126.

351. Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation / H. Yonezawa [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 197.
352. Identification of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa / M.A. Carron [et al.] // *J. Gastrointest. Surg.* – 2006. – Vol. 10, N 5. – P. 712 – 717.
353. Dynamic colonization of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa / L. Cellini [et al.] // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2008. – Vol. 43, N 2. – P. 178–185.
354. Presence and density of *Helicobacter pylori* biofilms in human gastric mucosa in patients with peptic ulcer disease / J.M. Coticchia [et al.] // *J. Gastrointest. Surg.* – 2006. – Vol. 10, N 6. – P. 883–889.
355. Macfarlane, S. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract / S. Macfarlane, J.F. Dillon // *J. Appl. Microbiol.* – 2007. – Vol. 102, N 5. – P. 1187–1196.
356. Wang, S.L. Meta-analysis of broad spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease / S.L. Wang, Z.R. Wang, C.Q. Yang // *Exp. Ther. Med.* – 2012. – Vol. 4, N 6. – P. 1051–1056.
357. Swidsinski, A. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis – an overview / A. Swidsinski, V. Loening-Baucke, A. Herber // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 60, suppl. 6. – P. 61–71.
358. Исаева, Г.Ш. Микробиота, биоплёнки и *Helicobacter Pylori* при заболеваниях гастродуоденальной зоны / Г.Ш. Исаева, В.Б. Зиятдинов // *Казан. мед. журн.* – 2014. – Т. 95, № 5. – С. 762–768.
359. Кузнецова, М.В. Микробиология нозокомиальной синегнойной инфекции: мониторинг распространенности, биологические особенности возбудителя и новые подходы к диагностике : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 03.02.03 / М.В. Кузнецова. – Пермь, 2014. – 44 с.
360. Suture-related keratitis caused by *Corynebacterium macginleyi* / T. Suzuki [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45, N 11. – P. 3833–3836.
361. Anderl, J.N. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin / J.N. Anderl, M.J. Franklin, P.S. Stewart // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2000. – Vol. 44, N 7. – P. 1818–1824.
362. Oglesby, L.L. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization / L.L. Oglesby, S. Jain, D.E. Ohman // *Microbiology.* – 2008. – Vol. 154, pt. 6. – P. 1605–1615.
363. Сидоренко, С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом / С.В. Сидоренко // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия.* – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 301–315.
364. Резистентность к антибиотикам госпитальных изолятов золотистого стафилококка, образующих биоплёнку / В.К. Окулич [и др.] // *Здравоохранение.* – 2015. – № 7. – С. 11–16.
365. Kabanova, A.A. Biofilm formation of the bacteria causing odontogenic infections / A.A. Kabanova // *In the World of Scientific Discoveries.* – 2014. – N 10. – P. 107–121.

366. Окулич, В.К. Микробиологические и иммунологические аспекты инфекций, вызванных условно-патогенными бактериями, образующими биопленку / В.К. Окулич // Вестн. ВГМУ. – 2016. – Т. 15, № 5. – С. 52–63.
367. Особенности клинического течения раневого процесса в зависимости от способности возбудителя формировать биопленку / В.И. Петухов [и др.] // Вестн. ВГМУ. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 100–105.
368. Плотников, Ф.В. Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности микроорганизмов-возбудителей формировать биопленку / Ф.В. Плотников // Новости хирургии. – 2014. – Т. 22, № 5. – С. 575–581.
369. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways / D.J. Hassett [et al.] // Trends. Microbiol. – 2009. – Vol. 17, N 3. – P. 130–138.
370. Федянин, С.Д. Рациональное использование антибактериальных препаратов в комплексном лечении хирургической инфекции : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.27 / С.Д. Федянин ; Витеб. гос. мед. ун-т. – Смоленск, 2006. – 20 с.
371. Особенности антибактериальной терапии в комплексном лечении гнойно-некротических поражений мягких тканей и гангрены нижних конечностей у пациентов сахарным диабетом / В.П. Булавкин [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 1999. – № 1. – С. 114–118.
372. Косинец, А.Н. Рациональная антибиотикотерапия у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями и осложнениями в хирургии / А.Н. Косинец, В.К. Окулич, С.Д. Федянин // Вестн. Рос. воен.-мед. акад. – 2005. – № 1. – С. 195–196.
373. Окулич, В.К. Рациональное использование антибактериальных препаратов у пациентов с гнойными ранами, фурункулезом, фурункулами и карбункулами / В.К. Окулич, С.Д. Федянин // Вестн. ВГМУ. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 30–36.
374. Окулич, В.К. Некоторые аспекты антибиотикорезистентности у пациентов с флегмонами / В.К. Окулич // Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам : материалы междунар. науч.-практ. конф., 27–28 мая 2003 г. – Минск, 2003. – С. 71–73.
375. Рациональное использование антибиотиков при лечении гематогенного и посттравматического остеомиелита / В.К. Окулич [и др.] // Новости хирургии. – 2009. – Т. 17, № 4. – С. 65–77.
376. Кабанова, А.А. Возбудители одонтогенного и травматического остеомиелита челюстей / А.А. Кабанова, С.А. Кабанова // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 72-й науч. сес. сотр. ун-та, 25–26 янв. 2017 г. – Витебск : ВГМУ, 2017. – С. 120–122.

Научное издание  
**Окулич** Виталий Константинович  
**Кабанова** Арина Александровна  
**Плотников** Филипп Викторович

**МИКРОБНЫЕ БИОПЛЕНКИ В КЛИНИЧЕСКОЙ  
МИКРОБИОЛОГИИ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ**

**Монография**

Редактор А.А.Кабанова, Ф.В. Плотников  
Технический редактор И.А.Борисов  
Компьютерная верстка А.А. Кабанова

Подписано в печать \_\_\_\_\_  
Формат 64х84 1/16.Бумага типографская №2.  
Усл.печ.л. \_\_\_\_\_  
Уч.- изд. л. \_\_\_\_\_  
Тираж \_\_\_\_\_ Заказ № \_\_\_\_\_

Издатель и полиграфическое исполнение:  
УО «Витебский государственный  
медицинский университет»  
Лицензия ЛП №02330/453 от 30.12.13 г.  
Пр-т Фрунзе, 27, 210602, г. Витебск